

**Untersuchung zu (epi)genetischen
Veränderungen auf Chromosom 11p15 und ihre
funktionelle Relevanz bei Patienten mit
Silver-Russell-Syndrom**

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

Nadine Schönherr

aus Troisdorf

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Thomas Eggermann

Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Johannes Bohrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2009

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	4
2. Einleitung	7
2.1 Phänotyp und Häufigkeit des SRS	7
2.2 Genetische Ursachen beim SRS	8
2.2.1 Epigenetik und genomisches Imprinting	9
2.2.2 Chromosomale Aberrationen beim SRS	10
2.2.2.1 Chromosom 7	11
2.2.2.2 Chromosom 11	16
2.2.2.2.1 Die chromosomale Region 11p15	16
2.2.2.2.2 Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS)	19
2.2.2.2.3 Chromosom 11-Befunde beim SRS	20
2.3 Zielsetzung	23
3. Material und Methoden	25
3.1 Material	25
3.1.1 Geräte und Zubehör	25
3.1.2 Chemikalien	27
3.1.3 Oligonukleotide	27
3.1.4 Feinchemikalien und Enzyme	27
3.1.5 Materialien und Reagenzien für die Zellkultur	29
3.1.6 Bakterienstämme, Plasmide und Zelllinien	30
3.1.6.1 Bakterienstämme	30
3.1.6.2 Plasmide	30
3.1.6.3 Zelllinien	31
3.1.7 Probanden-Kollektive	31
3.2 Methoden	34

3.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction)	34
3.2.2 Direkte Sequenzierung nach Sanger	35
3.2.3 Fragment-Analyse	36
3.2.3.1 Fragment-Analyse mit Silber-Detektion	37
3.2.3.2 Fragment-Analyse mit Fluoreszenz-Markierung	38
3.2.4 Nachweis von Epimutationen und UPDs	39
3.2.4.1 Mikrosatelliten-Analyse	39
3.2.4.2 Bisulphitbehandlung	40
3.2.4.2.1 Methylierungsspezifische-PCR (MS-PCR)	41
3.2.4.2.1.1 MS-PCR für Chromosom 7	41
3.2.4.2.1.2 MS-PCR für Chromosom 6 und Chromosom 14	42
3.2.4.2.2 MS-PCR zur Bisulphit-Sequenzierung	43
3.2.4.3 Multiplex ligation-dependant Probe Amplification (MLPA)	44
3.2.4.3.1 Methylierungsspezifische-MLPA (MS-MLPA)	45
3.2.5 Klonierung	47
3.2.5.1 TOPO TA Klonierung	47
3.2.5.1.1 Kolonie-PCR	49
3.2.5.2 Klonierung von Expressionsvektoren	50
3.2.5.3 Transformation	52
3.2.5.4 Plasmidisolation	54
3.2.5.4.1 Boiling-Präparation	54
3.2.5.4.1.1 Restriktionsverdau	55
3.2.5.4.2 Minipräparation	56
3.2.6 Zellkultur	57
3.2.6.1 EBV-Kulturen	57
3.2.6.2 HEK293- und Cos7-Zellkulturen	59
3.2.6.3 Primäre Plazentazellkultur	59
3.2.7 Transfektion	60
3.2.8 RNA-Isolation	61
3.2.9 RT-PCR („Reverse Transcription“-PCR)	61
3.2.10 Quantitative Real-Time PCR	63
3.2.10.1 Quantitative Real-Time PCR zur Expressionsanalyse	64

3.2.11 Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH)	67
3.2.11.1 Zwei-Farben FISH mit direkter Markierung der Sonden	68
3.2.12 Associated Chromosome Trap Assay (ACT)	69
3.2.13 Microarray	72
3.2.14 Datenbanken-Recherche NCBI/Aceview und UCSC	73
3.2.15 Untersuchung möglicher Splice-Enhancer mittels der ESEfinder-Software	74
 4. Ergebnisse	 75
4.1 Untersuchungen zu (epi)genetischen Veränderungen in 11p15 bei Patienten mit SRS	75
4.1.1 Häufigkeitsbestimmung von Hypomethylierungen der ICR1 in 11p15 beim SRS mit MS-MLPA	75
4.1.2 Untersuchung der Region 11p15 nach bisher unbekannten (Epi)mutationen	77
4.1.3 Ausschluss allgemeiner Hypomethylierungen beim SRS	78
4.1.4 11p15-Untersuchungen bei Patienten mit isolierter Wachstumsretardierung	79
4.1.5 Bestimmung des genauen Methylierungsmusters der CTCF-Bindestelle 3	80
4.1.6 Identifizierung und Charakterisierung einer maternalen Duplikation in 11p15	82
4.2 Genauere Charakterisierung einer isolierten maternalen ICR2-Duplikation	83
4.2.1 Segregationsanalysen bei Familie FN	83
4.2.3 Expressionsanalyse des Gens <i>CDKN1C</i>	85
4.2.4 Expressionsanalyse des Gens <i>KCNQ1</i>	86
4.3 Untersuchung des Spliceverhaltens varianter Sequenzen des Gens <i>H19</i>	87
4.3.1 Splicinganalysen der varianten <i>H19</i> -Sequenzen durch Transfektion in HEK293 und Cos7	88
4.3.2 Untersuchung der monoallelischen Expression von <i>H19</i> bei SR93K	92
4.4 Untersuchung von (epi)genetischen Veränderungen auf Chromosom 7 bei SRS-Patienten	93
4.4.1 Nachweis segmentaler UPDs(7) mat	93
4.4.2 Ausschluss isolierter Methylierungsdefekte innerhalb von 7q32	94

4.5 Nachweis interchromosomaler Interaktionen der Chromosomen 11 und 7	95
4.5.1 Zwei-Farben-FISH an plazentaren Interphase-Kernen	95
4.5.2 Associated Chromosome Trap Assay (ACT)	98
4.5.3 Quantitative Expressionsanalyse nach Transfektion plazentarer Zellkulturen mit <i>CTCF</i> -Konstrukten	99
4.6 Etablierung der 500K SNP-Microarray-Technologie	100
4.6.1 Bestätigung der Duplikation mit Hilfe von Mikrosatelliten-Analysen	102
5. Diskussion	103
5.1 (Epi)genetische Veränderungen in 11p15 beim SRS	103
5.1.1 Häufigkeitsbestimmung der ICR1-Hypomethylierungen bei SRS-Patienten und bei Patienten mit allgemeiner Wachstumsretardierung	103
5.1.2 Relevanz seltener sowie bisher unbekannter 11p15-(Epi)mutationen beim SRS	105
5.1.3 Ausschluss eines allgemeinen Hypomethylierungssyndrom beim SRS	107
5.2 Charakterisierung einer isolierten maternalen ICR2-Duplikation	107
5.3 Relevanz der untranslatierten RNA H19 für das SRS	111
5.4 Bedeutung (epi)genetischer Veränderungen auf Chromosom 7 für das SRS	114
5.5 Interchromosomale Interaktionen der geprägten Regionen auf Chromosom 11 und 7	116
5.5.1 Potentielle Regulation der mit dem SRS assoziierten Regionen durch gemeinsame Faktoren	118
5.6 Verwendung der Microarray-Technologie für die Diagnostik des SRS	119
5.7 Ausblick	121
6. Anhang	123
7. Literaturliste	130
7.1 In dieser Arbeit zitierte Publikationen	130
7.2 Eigene Publikationen	136

Danksagung

Curriculum Vitae

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
APS	Ammoniumpersulfat
AMV-RT	<i>avian myoblastosis virus-Reverse Transkriptase</i>
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
Bp	Basenpaare
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
C	Cytosin
<i>CDKN1C</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1C</i>
cDNA	komplementäre DNA
Chr.	Chromosom
CTCF	<i>CCCTC-binding factor</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
deion.	deionisiert
DMR	<i>differentially methylated region</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleotidtriphosphat
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Dideoxynukleotidtriphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetracetat
<i>EGFR</i>	<i>epidermal growth factor receptor</i>
FBLP	Frischblutlysepuffer
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FKS	Fötales Kälberserum
G	Guanin
<i>GRB10</i>	<i>growth factor receptor bound protein gene 10</i>
ICR	<i>imprinting center region</i>
<i>IGF2</i>	<i>insulin-like growth factor 2</i>
IUGR	<i>intrauterine growth retardation</i>
kb	Kilobasenpaare
<i>KCNQ1OT1/LIT1</i>	<i>KCNQ-overlapping transcript 1</i>
LOI	<i>loss of imprinting</i>
mat	maternal
Mbp	Megabasenpaare
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	methylierungsspezifisch
<i>MYC</i>	<i>avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
OMIM	<i>Online mendelian inheritance in man</i>
OT	Objektträger
p.a.	per analysis
PAA	Polyacrylamid
pat	paternal
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>

Abkürzungsverzeichnis

<i>PEG1/MEST</i>	<i>paternal expressed gene 1/mesoderm specific transcript</i>
PNGR	<i>postnatal growth retardation</i>
pter	terminals Ende des p-Arms
qter	terminales Ende des q-Arms
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse transcription PCR</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SRS	Silver-Russell Syndrom
T	Thymin
T _A	Annealing-Temperatur
<i>TBP</i>	<i>TATA-box binding protein</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
UPD	Uniparentale Disomie
UPD(7)mat	maternale UPD 7
UPD(7)pat	paternale UPD 7
WT	Wildtyp

1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Das Silver-Russell Syndrom (SRS) ist ein klinisch und genetisch heterogenes Fehlbildungssyndrom, das hauptsächlich mit einer schweren intrauterinen und postnatalen Wachstumsretardierung assoziiert ist. Hinzu kommen typische Gesichtsdysmorphien und weitere charakteristische Symptome. Eine genetische Bestätigung des klinischen Befundes ist derzeit lediglich für einen Teil der Patienten möglich, wobei in ~38-63% Aberrationen der chromosomalen Region 11p15 und in 7-10% Defekte auf Chromosom 7 nachgewiesen werden können (zur Übersicht: Eggermann et al., 2008).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung (epi)genetischer Veränderungen innerhalb der chromosomalen Region 11p15 sowie ihre funktionelle Relevanz für das Silver-Russell Syndrom (SRS) zu untersuchen. Hierzu wurden methylierungsspezifische Analysen bei 72 klinisch gut charakterisierten SRS-Patienten, 188 Patienten der SRS-Routinediagnostik sowie 108 Patienten mit isolierter Wachstumsretardierung und nicht SRS-spezifischen Merkmalen durchgeführt.

Zu Beginn der vorliegenden Dissertation detektierten Gicquel et al. (2005) erstmals Hypomethylierungen der ICR1 in 11p15 bei Patienten mit SRS. Aufgrund dieser Beobachtungen erfolgte in der vorliegenden Arbeit zunächst eine Bestimmung der Häufigkeit dieser Aberration mittels methylierungssensitiver *Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification*-(MLPA) Analysen. Hierbei konnte in dem Kollektiv von klinisch gut charakterisierten SRS-Patienten eine Rate von 44,4% und bei den Patienten der Routinediagnostik, die klinisch schlechter charakterisiert sind, von lediglich 15,3% nachgewiesen werden (Eggermann et al., 2008c). Bei den 108 Patienten mit isolierter Wachstumsretardierung und nicht SRS-spezifischen Merkmalen konnte eine ICR1-Hypomethylierung ausgeschlossen werden, sodass es sich bei dieser Veränderung mit großer Wahrscheinlichkeit um eine für das SRS spezifische Epimutation handelt (Eggermann et al., 2008b).

Diese methylierungsspezifischen Analysen konnten in dem verwendeten Kollektiv keine weiteren bisher unbeschriebenen (Epi)mutationen in 11p15, wie zum Beispiel Methylierungsdefekte in der ICR2 oder Mikrodeletionen, nachweisen (Eggermann et al., 2008c). Auch Hypomethylierungen weiterer elterlich geprägter Regionen, zusätzlich zu der

ICR1 in 11p15, wurden in dem untersuchten SRS-Kollektiv nicht detektiert (Schönherr et al., 2007b). Aufgrund der Berichte ähnlicher Veränderungen bei anderen Imprinting-Syndromen, wie dem Beckwith-Wiedemann Syndrom, sind solche (Epi)mutationen bei einzelnen Patienten mit SRS jedoch nicht auszuschließen (Niemitz et al., 2004; Sparago et al., 2004; Rossignol et al., 2006).

Der in der vorliegenden Arbeit genauer charakterisierte Fall einer isolierten maternalen Duplikation der ICR2 in 11p15 bei dem SRS-Patienten FN und seiner klinisch unauffälligen Mutter (Schönherr et al., 2007a) zeigt, dass für das SRS auch (epi)genetische Veränderungen relevant sein können, die nur in vereinzelten Fällen nachgewiesen werden. Bisher wurden für die Region 11p15 neben den Methylierungsdefekten der ICR1 bei einigen Patienten mit SRS auch maternale Duplikationen detektiert, die jedoch immer sowohl die ICR1 als auch die ICR2 mit einschlossen. In dem vorliegenden Fall des Patienten FN war jedoch ausschließlich die ICR2 betroffen. Die klinisch unauffällige Mutter erbt die Abberation von ihrem Vater. Somit kann eine Relevanz elterlich geprägter Faktoren der ICR2 für das SRS vermutet werden. Expressionsanalysen des wachstumsrelevanten und geprägten Faktors *CDKN1C* sowie für ein weiteres innerhalb der Duplikation lokalisiertes Gen (*KCNQ1*) wurden bei dem Patienten FN und seiner Mutter durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine weitere maternale Duplikation in 11p15, die sowohl die ICR1 als auch die ICR2 mit einschloss, detektiert und charakterisiert werden.

Des Weiteren wurden funktionelle Analysen zu drei Varianten innerhalb des SRS-Kandidatengens *H19* durchgeführt (Schönherr et al., 2008). Expressionsanalysen in HEK293- und Cos7-Zellen mit Konstrukten der verschiedenen Varianten zeigten ein verändertes Spliceverhalten bei zwei der drei Patienten (SR81K, SR93K), jedoch nicht bei der Patientin SR17K. Expressionsanalysen an RNA aus Lymphozyten der Patientin SR93K und ihrem Vater wurden durchgeführt. Eine Expression des varianten Transkripts lag, aufgrund des Imprintings von *H19*, jedoch nur bei dem Vater vor, der die Variante maternal geerbt hatte. Zusätzlich zu Analysen der Region 11p15 wurden Untersuchungen zu Veränderungen auf Chromosom 7 durchgeführt. Bei zwei Patienten mit SRS konnte hierbei eine segmentale Uniparentale Disomie eines Abschnittes des Chromosoms 7q detektiert werden (Eggermann et al., 2008d). Hierbei handelt es sich um eine bisher selten beschriebene Mutation (Hannula et al., 2001; Reboul et al., 2006), deren Relevanz für das SRS durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weiter bestätigt wurde. Isolierte Methylierungsdefekte innerhalb der elterlich geprägten Region 7q32, für die eine Rolle für die Ätiologie des SRS denkbar wäre,

wurden hingegen bei 54 SRS-Patienten ohne Hypomethylierung in 11p15 nicht nachgewiesen (Schönherr et al., 2007b).

Um einen möglichen funktionellen Zusammenhang zwischen den mit dem SRS assoziierten Regionen auf den Chromosomen 7 und 11 zu untersuchen, wurden Analysen zu potentiellen interchromosomalen Interaktionen dieser Regionen durchgeführt. Die Anwendung einer Zwei-Farben-FISH in plazentaren Interphase-Kernen zeigte eine Kolo-kalisation der chromosomalen Region 11p15 mit 7p12-p11.2 (*GRB10*) und 7q32 (*PEG1/MEST*) in einzelnen analysierten Zellkernen. Die beobachteten Interaktionen beschränkten sich fast ausschließlich auf jeweils ein Allel. Aufgrund der elterlichen Prägung der Regionen liegt eine Assoziation somit vermutlich nur zwischen Chromosomen einer bestimmten parentalen Herkunft vor. Eine erste Anwendung des Associated Chromosome Trap Assays (ACT) erzielte bisher keine Bestätigung der Interaktionen, jedoch soll dies zukünftig durch eine bessere Etablierung des Verfahrens ermöglicht werden.

Quantitative Expressionsanalysen sollten zeigen, ob es eine Beeinflussung der Expression der in 7p12-p11.2 und 7q32 lokalisierten elterlich geprägten SRS-Kandidatengene durch das Protein CTCF gibt. CTCF ist ein Regulator der Expression und des Imprintings diverser Gene, unter anderem der ICR1 in 11p15 (zur Übersicht: Eggermann et al., 2008a). Bei diesen Versuchen konnte eine deutliche Inhibition der Expression des wachstumsrelevanten Faktors *PEG1/MEST* in 7q bei erhöhter CTCF-Konzentration in primären Trophoblasten-Zellkulturen nachgewiesen werden. Eine Regulation dieser beiden mit dem SRS assoziierten Regionen durch einen gemeinsamen übergeordneten Mechanismus ist somit vorstellbar und könnte ihren Zusammenhang an der Ätiologie des SRS erklären.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte des Weiteren die Etablierung der 500K SNP-Microarrays-Technologie.

1.2 Summary

Analyses of (epi)genetic changes in chromosome 11p15 and their functional relevance for Silver-Russell syndrome

Silver-Russell syndrome (SRS) is a clinically and genetically heterogenous syndrome, which is mainly associated with severe intrauterine and postnatal growth retardation. Typical facial dysmorphisms and further characteristic symptoms can additionally be observed. So far the clinical diagnosis can not be confirmed in all patients with SRS. ~38-63% of SRS patients carry (epi)genetic mutations in 11p15 and in ~7-10% defects on chromosome 7 can be detected (for review: Eggermann et al., 2008).

One of the main tasks of this doctoral thesis was the analyses of (epi)genetic changes in the chromosomal region 11p15 and the verification of their functional relevance for the etiology of SRS. Therefore methylation-specific analyses were carried out in 72 well characterised patients with SRS, 188 patients referred for routine SRS-diagnostics and additional 108 patients with isolated growth retardation and further clinical signs not consistent with SRS.

At the beginning of this project Gicquel et al. (2005) firstly detected a hypomethylation of the ICR1 (*imprinting control region*) in 11p15 in SRS patients. Due to these observations we carried out Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification (MLPA) analyses to determine the frequency of this aberration. While 44.4% of the well characterised SRS patients showed hypomethylation of the ICR1, in case of patients from routine SRS diagnostics a frequency of only 15.3% could be detected (Eggermann et al., 2008c). None of the patients with isolated growth retardation and further clinical signs not consistent with SRS showed a hypomethylation of 11p15, thereby confirming the assumption that this epimutation is specific for SRS (Eggermann et al., 2008b).

Further analyses of the results from this methylation specific assay did not reveal any other so far unknown (epi)genetic disturbances in 11p15, such as methylation defects in the ICR2 or microdeletions (Eggermann et al., 2008c). Hypomethylation of further imprinted regions in the genome additionally to the ICR1 could also not be detected in the analysed SRS patients (Schönherr et al., 2007b). Due to the reports of similar (epi)genetic findings in other imprinting disorders, i.e. in Beckwith-Wiedemann syndrome, these kind of aberrations may be conceivable to be the cause for single SRS cases (Niemitz et al., 2004; Sparago et al., 2004; Rossignol et al., 2006).

The statement that also rare (epi)genetic disturbances can be responsible for SRS can unambiguously be supported by our detection of the first case with a maternal duplication restricted to the ICR2 in 11p15 in a patient with SRS (FN) and his clinically unaffected mother. It is known that some patients with SRS show a maternal duplication in 11p15 in addition to the methylation defects in the ICR1. However, these aberrations always included both imprinting control regions, ICR1 and ICR2. In the present case (FN) only the centromeric ICR2 was affected. The unaffected mother inherited the duplication from her father, thus making a relevance of imprinted factors in the ICR2 probable for the etiology of SRS. Investigations on the functional consequence of this duplication were carried out by analysing the expression of the growth relevant and imprinted factor CDKN1C and a further gene (*KCNQ1*) localised in the duplicated region, in lymphocytes of the patient FN and his mother.

Another maternal duplication in 11p15 could be detected and further characterised in the SRS patient LE where the duplication includes the ICR1 and ICR2.

Moreover, functional analyses on three variations of the genomic sequence in the SRS-candidate gene *H19* have been performed (Schönherr et al., 2008). We therefore carried out expression analyses in cultured HEK293- and Cos7-cells after transfection with constructs containing the different variants. An altered splicing of the *H19* mRNA in comparison to wild-type construct could be found in two of the three patients (SR81K; SR93K), but not in the patient SR17K. Analysing RNA from lymphocytes of the patient SR93K and her father showed an expression of the variant allele only in the father who inherited this mutation from his mother. This can be explained by the imprinting of the gene, which inhibits an expression of *H19* only from the paternal allele. Further investigations should be performed to precisely estimate the relevance of these aberrations for the etiology of SRS.

In addition to the analyses for chromosome 11p15 we performed investigations on disturbances of chromosome 7. Two of the analysed SRS patients showed a segmental uniparental disomy of chromosome 7q (Eggermann et al., 2008d), which is a very rare aberration and to date only reported in two further cases of SRS (Hannula et al., 2001; Reboul et al., 2006). Therefore, our results clearly support the relevance of this scarce genetic finding. Isolated methylation defects in the imprinted region 7q32, which might have a functional role in SRS, could not be observed in 54 SRS patients without hypomethylation in 11p15.

To determine a possible functional link between the different imprinted regions associated with SRS on chromosome 11 and 7, analyses to detect potential interchromosomal

interactions between these regions were carried out. Multicolour-FISH analyses showed a colocalisation of the chromosomal region 11p15 with 7p12-p11.2 (*GRB10*) and 7q32 (*PEG1/MEST*) in single placental interphase nuclei. These interactions were always restricted to one allele, which might lead to the assumption that, due to the imprinting of these regions, the association is essential only between the two chromosomes of one defined parental origin. While the first applications of an Associated-Chromosome Trap (ACT)-assay did not reveal a confirmation of the observed interactions, a suitable establishment of this and further methods should achieve better results in future projects.

Furthermore quantitative analyses were carried out to show a possible influence of the protein CTCF on the expression of the genes localised in the SRS-candidate regions 7p12-p11.2 and 7q32. CTCF is a regulator of expression and imprinting of various genes, among others for the genes localised in the ICR1 (for review: Eggermann et al., 2008a). Analyses in placental primary cell cultures clearly showed an inhibition of the *PEG1/MEST* expression by CTCF. Therefore a common mechanism for the regulation of these two SRS-associated regions might be conceivable and could explain their link in the etiology of SRS.

Additionally the establishment of the 500K-Microarray technology (Affymetrix) was carried out in the recent project.

2. Einleitung

2.1 Phänotyp und Häufigkeit des SRS

Beim Silver-Russell Syndrom (SRS) (RSS; OMIM *180860) handelt es sich um ein heterogenes Fehlbildungssyndrom (s. Abb. 2.1), welches erstmals von Silver et al. (1953) und Russell et al. (1954) beschrieben wurde.



Abb. 2.1: Sieben jähriger Junge mit SRS und Hypomethylierung in 11p15 (Eggermann et al., 2008b)

Hauptsächlich charakterisiert ist es durch eine prä- und postnatale Wachstumsrestriktion sowie durch Merkmale, die in Haupt- und Nebensymptome untergliedert sind (Wollmann et al., 1995; Price et al., 1999) (s. Tab.2.1). Nach neuesten Kriterien, definiert durch Netchine et al. (2007), sollten zur klinischen Diagnosestellung eines SRS neben stark reduzierten Geburtsmaßen ($\leq -2SD$) drei der fünf folgenden Merkmale vorliegen: postnatale Wachstumsrestriktion, relative Makrozephalie bedingt durch ein nicht-reduziertes Kopfwachstum (ca. 50. Perzentile), Asymmetrien von Gesicht bzw. Gliedmaßen, eine betonte Stirn, sowie Ernährungsschwierigkeiten im Kleinkindalter.

Neben den oben beschriebenen Merkmalen können beim SRS weitere nicht obligate Auffälligkeiten beobachtet werden. Typisch sind unter anderen faziale Dysmorphien, wie eine dreieckige Gesichtsform oder Ohranomalien, eine Vier-Fingerfurche, psychomotorische

Retardierung und eine Klinodaktylie V (s. Tab. 2.1). Das Wachstum verläuft bei den Patienten meist unterhalb der dritten Perzentile, sodass Frauen ohne Wachstumshormonbehandlung eine Endgröße von ~139 cm und Männer von ~149 cm erreichen (Price et al., 1999).

Tab. 2.1: Klinische Symptome des SRS

	Hauptsymptome	Nebensymptome	Einzelbefunde
Wachstum und Entwicklung	- Intrauterine Wachstumsretardierung (<P3) - Postnatale Wachstumsretardierung (<P3) - Trinkschwäche	- Verzögertes Knochenalter	- Verzögerter Fontanellen-Verschluss
Kraniofaziale Auffälligkeiten	- Relative Makrozephalie - Dreieckige Gesichtsform - Prominente Stirn - Mikrognathie - Herabhängende Mundwinkel - Gesichtsdysproportionen	- Niedrig-angesetzte Ohren/Ohranomalien - Zahnfehlstellungen - Hoher Gaumen/Gaumenspalte	- Antevertierte Nares - Blaue Skleren - Epikanthus - Congenitale Ptosis - Zusammen-gewachsene Augenbrauen
Körper und Extremitäten	- Asymmetrie der Extremitäten - Klinodaktylie V - Brachydaktylie V - Hemihypertrophie des Stamms/der Extremitäten	- Syndaktylie der Zehen II/III - Muskuläre Hypotonie/Hypotrophie - Hypospadie - Cryptorchismus	- Café-au-lait-Flecken - Kurzer Hals - Vierfingerfurche

Generell beobachtet man eine Abschwächung der klinischen Symptome, vor allem der fazialen Dysmorphien, im Erwachsenenalter der Patienten. Wie bereits erwähnt variiert die Ausprägung der einzelnen Symptome, sodass man je nach genetischer Ursache einen unterschiedlichen Phänotyp vermutet.

Die Angaben zur Inzidenz des SRS schwanken stark zwischen Häufigkeiten von ca. 1:10.000 (Monk et al., 2002) und 1:3.000 bis 1:100.000 nach aktuelleren Arbeiten (Falkert et al., 2005).

2.2 Genetische Ursachen beim SRS

Das Silver-Russell Syndrom (SRS) tritt meist sporadisch auf und ist genetisch sehr heterogen. Vereinzelt finden sich allerdings auch familiäre Fälle, wobei hier kein einheitlicher Vererbungsmodus erkennbar ist (zur Übersicht: Hitchins et al., 2001).

Bei den sporadischen Fällen können vor allem (epi)genetische Veränderungen auf Chromosom 7 und 11 nachgewiesen werden. Chromosomale Aberrationen anderer Regionen werden hingegen selten beschrieben und machen eine sichere Zuordnung zur Ätiologie des SRS unklar.

2.2.1 Epigenetik und genomisches Imprinting

Bisher können für das SRS hauptsächlich Veränderungen beobachtet werden, die einem direkten epigenetischen Defekt zugrunde liegen oder eine Fehlregulationen geprägter Gene verursachen.

Epigenetik beschreibt spezifische, reversible Modifikationen des Genoms zur Regulation der Genexpression. Diese Regulationsmechanismen werden nicht über Veränderungen innerhalb der Basensequenz gesteuert, sondern durch chemische Modifizierung der Histone (Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung) und Methylierung der DNA beeinflusst. Diese Veränderungen verursachen eine Wirkung auf die Chromatinstruktur, wobei eine Acetylierung der Histone eine Auflockerung und eine Methylierung der Histone eine Kondensation des Chromatins bewirkt.

Man unterscheidet zwei verschiedene Chromatinzustände, das Euchromatin und das Heterochromatin. Während das Euchromatin die meisten transkribierten Gene beinhaltet und in der Interphase meist dekontensiert vorliegt, stellt das Heterochromatin die inaktive, kondensierte Form der DNA dar.

Ein weiteres epigenetisches Regulationselement ist die Methylierung der DNA. Die Methylierung erfolgt an Cytosinen innerhalb sogenannter CpG-Inseln, bei denen es sich um kleinere genomische DNA-Regionen repetitiver Cytosin- und Guanin-Abfolgen handelt. DNA-Methyltransferasen ermöglichen eine stabile Weitergabe dieser Methylierungsmuster. Die Methylierung der DNA bewirkt in den meisten Fällen eine Hemmung der Expression durch sie regulierter Gene. Um eine Reprogrammierung des Imprintings zu ermöglichen finden während der Keimzellentwicklung eine nahezu komplette Demethylierung sowie eine anschließende Remethylierung des Genoms statt.

Je nach Zelltyp und Geschlecht liegt ein unterschiedliches Epigenom vor, sodass eine Differenzierung der Zellen auch bedingt durch verschiedene Epigenotypen besteht (Beck et al., 2005). Epigenetische- bzw. Imprinting-Modifikationen können ebenso wie Mutationen in der Basenabfolge zu pathologischen Veränderungen führen (Epimutation).

Werden Gene aufgrund von unterschiedlichen Methylierungsmustern je nach elterlicher Herkunft unterschiedlich exprimiert, so spricht man von elterlicher Prägung, bzw. genomischen Imprinting. Demnach ist also nur eine der parentalen Kopie eines geprägten Genes aktiv.

Elterlich geprägte Gene liegen meist in Clustern vor, in denen ihre Expression von einem gemeinsamen, unterschiedlich methylierten Imprintingcenter (ICR) reguliert wird. Unterschiedlich methylierte Regionen (*Differentially Methylated Regions, DMRs*) können jedoch auch innerhalb von Promoterregionen einzelner Gene auftreten. Innerhalb dieser Regionen findet man die bereits beschriebenen CpG-Inseln, die von Methylgruppen gebunden sind. Ein methyliertes, inhibiertes Gen wird als geprägtes Gen bezeichnet.

Des Weiteren können Antisense-Transkripte die Expression geprägter Gene beeinflussen. Hierbei handelt es sich um untranslatierte RNAs, die innerhalb eines Gens in entgegengesetzter Richtung exprimiert werden und eine Regulation des überlappenden Gens durch verschiedenste Mechanismen verursachen (Smilnich et al., 1999).

Zur Ausprägung des SRS führen epigenetische Fehlregulationen elterlich geprägter Regionen auf Chromosomen 7 und 11.

2.2.2 Chromosomale Aberrationen beim SRS

Innerhalb der letzten Jahre konnte die Diagnostik für das SRS stark ausgeweitet werden. Wurden bis vor kurzem lediglich Aberrationen auf Chromosom 7 als häufigste, bekannte Ursache bei Patienten mit SRS nachgewiesen, so zeichnet sich nun ab, dass die molekulargenetische Diagnosestellung mit dem Nachweis erst kürzlich beschriebener (epi)genetischer Veränderungen auf Chromosom 11 um einen großen Anteil erhöht wird (Gicquel et al., 2005).

Strukturelle Chromosomenaberrationen sind bisher eher selten beschrieben, sollten jedoch aufgrund der großen genetischen Heterogenität nicht außer Acht gelassen werden.

Umbauten der Chromosomen 8 und 15 wurden in Verbindung mit SRS-ähnlichen Symptomen beschrieben. Ein konkreter Zusammenhang zum SRS bleibt allerdings unbestätigt.

Im Fall von Chromosom 15 beobachtete man bei einigen Patienten mit SRS-ähnlichem Phänotyp und schwerer prä- und postnataler Wachstumsretardierung eine Deletion des distalen Abschnitts des q-Arms, der das Gen für den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-

Rezeptor I (*IGFIR*, *insulin-like growth factor receptor I gene*; 15q26) mit einschließt (Hitchins et al., 2001). *IGFIR* ist wie *IGF2* (s. 2.2.2.2.1) ein Mitglied der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-Familie (Milner und Hill, 1984 und Jones und Clemons, 1995). Es konnten jedoch keine pathogenen Mutationen innerhalb dieses Gens bei SRS-Patienten detektiert werden (Binder et al., 2002).

Balancierte Translokationen in 17q24-q25 wurden bei zwei Patienten mit Wachstumsretardierung und SRS-ähnlichem Phänotyp beobachtet. Die Bruchpunkte dieser beiden Translokationen waren nicht identisch, allerdings identifizierte man in der Nähe der Translokationsbruchpunkte Mitglieder der Wachstumsfaktor-Rezeptor-Bindeprotein-Familie (*GRB*, *growth factor bound protein genes*). In keinem dieser Gene konnten pathogene Mutationen bei SRS-Patienten detektiert werden (Hitchins et al., 2001). Auch ein Einfluss des *KPNA2* (*karyopherin α2*) und des *CSH1* (*chorionic somatomammotropin hormone 1*) als weitere Kandidatengene für die Ätiologie des SRS konnte ausgeschlossen werden (Dörr et al., 2001; Eggermann et al., 2007).

Somit reduzieren sich die derzeitigen Kandidatenregionen für das SRS auf die elterlich geprägten Regionen 7p12.1-p13, 7q31-qter und 11p15.

2.2.2.1 Chromosom 7

Chromosomale Veränderungen auf Chromosom 7 haben eine zentrale Bedeutung in der Ätiologie des SRS. Verschiedenste Aberrationen alleine auf diesem Chromosom verdeutlichen erneut die Heterogenität dieses Syndroms. Neben Patienten mit Duplikationen konnten auch Inversionen und Translokationen beobachtet werden. Mit Hilfe dieser Umbauten lassen sich zwei relevante Kandidatenregionen für das SRS auf Chromosom 7 definieren. Die beschriebenen Duplikationen grenzen die erste Kandidatenregion in 7p11.2-p13 ein, während sich die zweite Region in 7q durch segmentale uniparentale Disomien (s.u.) und Bruchpunkten von Inversionen und einer Translokation auszeichnet (Dupont et al., 2002; Eggermann et al., 2008a).

Beide Kandidatenregionen werden charakterisiert durch das Vorhandensein elterlich geprägter, wachstumsregulierender Gene und Imprinting-Domänen (Hitchins et al., 2001).

Duplikationen in 7p12.1-p13

Die erste bekannte Duplikation in 7p12.1-p13 wurde 1999 von Joyce et al. bei einer Mutter und ihrer Tochter beschrieben. Beide Patienten zeigen einen typischen SRS-Phänotyp mit Kleinwuchs, Gesichtsasymmetrien und einer Klinodaktylie V.

Monk et al. (2000) berichteten über einen weiteren Fall mit einer maternal vererbten Duplikation von 7p11.2-p13 bei einem Patienten mit SRS-Merkmalen.

Innerhalb der duplizierten Region sind unter anderem die Gene *GRB10* (growth factor receptor bound protein 10), *EGFR* (epidermal growth factor receptor), *IGFBP1* und *IGFBP3* (insulin-like growth factor binding protein 1 und 3) lokalisiert, welche eine Funktion in Wachstum und Embryonalentwicklung aufweisen. Bei Mutationsanalysen dieser Gene konnten jedoch keine molekulargenetischen Veränderungen nachgewiesen werden, die einen Hinweis auf eine zentrale Beteiligung an der Ätiologie des SRS geben (zur Übersicht: Hitchins et al., 2001).

Zu den interessantesten Kandidatengen in 7p zählt *GRB10*, dessen Regulation der elterlichen Prägung unterliegt. Seine untranslatierte Region besitzt zwei CpG-Inseln von denen die kleinere unterschiedlich methyliert ist, wodurch *GRB10* hoch isoform- und gewebespezifisch exprimiert wird. GRB10 bindet mit Hilfe seiner SH2 Domäne den Insulin-Rezeptor und den Insulin-like growth factor I-receptor (IGF1R) und inhibiert somit deren Tyrosin-Kinase Aktivität, welche involviert ist in den wachstumsfördernden Aktivitäten von Insulin und IGFI und II. In der Maus wird *Grb10* vorwiegend vom maternalen Allel exprimiert. Versuche bei der Maus zeigten bei Verlust von *Grb10* einen fetalen und plazentalen Großwuchs, während eine Überexpression von *Grb10* eine postnatale Wachstumsretardierung verursacht, was seine Rolle als Wachstumsrepressor unterstreicht (Charalambous et al., 2003; Shiura et al., 2005). Obwohl bisher keine pathogenen Veränderungen in Mutationsscreenings für *GRB10* in mehreren SRS-Kollektiven detektiert wurden, ist eine Beteiligung an der Ätiologie des SRS, bedingt durch seine Rolle in der Wachstumsregulation über andere regulative Wege, denkbar.

Inversionen und Translokationen auf Chromosom 7

Bisher konnten vier Patienten mit Inversion des Chromosom 7 (Nakabayashi et al., 2002; Monk et al., 2002) nachgewiesen werden. Die Bruchpunkte liegen bei drei dieser Patienten in der Region 7p11.2, innerhalb der oben beschriebenen Duplikations-Region, was auf einen Zusammenhang zum SRS schließen lässt.

Des Weiteren wurde eine Translokation zwischen den Chromosomen 7 und 16 mit Bruchpunkt in 7q (Dupont et al., 2002), sowie eine Translokation zwischen den Chromosomen 7 und 14 mit Bruchpunkt in 7p11.1 (Monk et al., 2002) beschrieben. Obwohl beide Bruchpunkte außerhalb der Duplikations-Region 7p11.1-p13 lokalisiert sind, ist eine Rolle dieser Veränderungen in der Symptomatik des SRS nicht auszuschließen.

Maternale Uniparentale Disomie 7

Bei ~7-10% der Patienten mit SRS kann der klinische Befund molekulargenetisch durch Identifizierung einer maternalen Uniparentalen Disomie des Chromosom 7 (UPD(7)mat) bestätigt werden (Kotzot et al., 1995; Eggermann et al., 1997; Preece et al., 1999). Hierbei liegen die beiden Chromosomen 7 nicht wie gewöhnlich als homologes Paar unterschiedlicher parentaler Herkunft vor, sondern beide Chromosomen werden von der Mutter vererbt.

Uniparentale Disomien (UPD) werden generell je nach elterlicher Herkunft der Chromosomen in maternale oder paternale UPDs unterschieden. Des Weiteren unterscheidet man Isodisomien (UPiD), wobei dasselbe elterliche Homolog dupliziert vorliegt, und Heterodisomien (UPhD), d.h. beide homologen Chromosomen eines Elternteils werden vererbt. Bei Patienten mit SRS werden sowohl Hetero- als auch Isodisomien beobachtet.

Die Vererbung eines homologen Chromosomenpaares von nur einem der beiden Elternteile erfolgt meist über eine Fehlverteilung während der Meiose oder Mitose. Für die Entstehung werden verschiedene Mechanismen diskutiert (Kotzot et al., 2005) (s. Abb. 2.2).

Bei dem so genannten „Trisomy Rescue“ kommt es durch eine Fehlverteilung während der Meiose (Nondisjunction) zur Entstehung einer disomen Gamete. Bei der anschließenden Verschmelzung mit einer normalen monosomen Gamete während der Befruchtung bildet sich dann eine trisome Zygote. Da abgesehen von den Trisomien 13, 18 und 21 andere autosomal numerische Aberrationen letal wirken, überleben nur solche Fruchtanlagen, bei denen es anschließend zu dem Verlust eines der überzähligen Chromosomen kommt. Da die Wahrscheinlichkeit des Verlustes für jedes der drei Chromosomen gleich groß ist, führt dies in einem Drittel der Fälle zur Entstehung einer UPD. Findet dieser Mechanismus postzygotisch statt, so bildet sich ein Mosaik.

Ein weiterer Mechanismus zur Entstehung einer UPD stellt das „Monosomy Rescue“ dar. Hierbei kommt es, ebenfalls durch eine Fehlverteilung während der Meiose, zur Bildung einer nullisomen Gamete, die bei Verschmelzung mit einer normalen Gamete zu einer monosomen Zygote führt. Mit Hilfe einer mitotischen Endoduplikation kommt es zur Bildung einer

uniparentalen Isodisomie. Während das „Trisomy Rescue“ hauptsächlich bei maternalen UPDs beobachtet wird, findet man das „Monosomy Rescue“ als Entstehungsmechanismus häufiger bei paternalen UPDs.

Weitere seltenere Ursachen wie die „Gamete Complementation“ und der „Postfertilization Error“ werden zusätzlich berichtet.

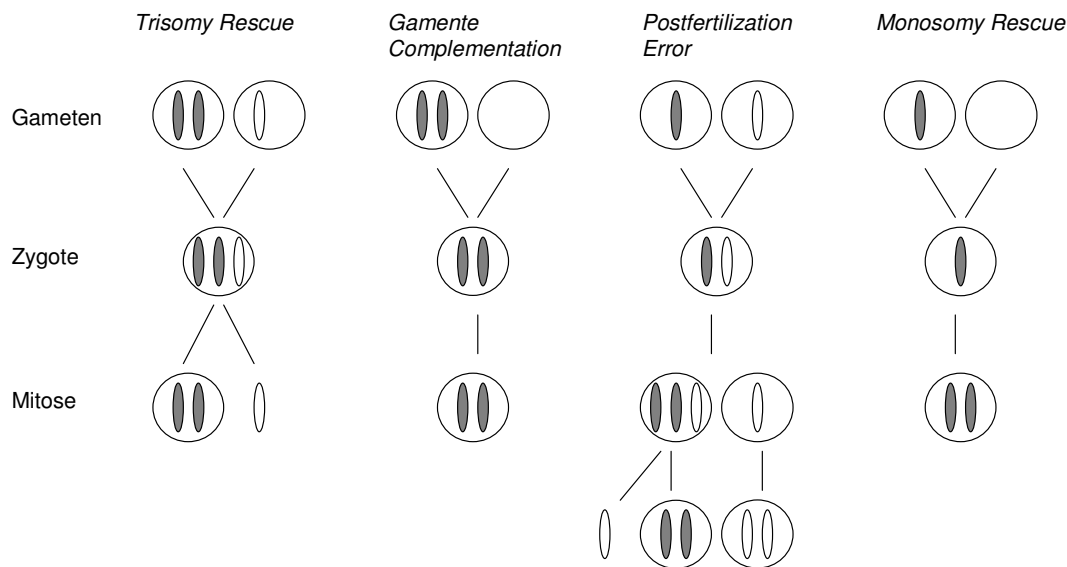


Abb. 2.2: Entstehungsmechanismen einer Uniparentalen Disomie

Das Vorliegen einer UPD führt nur zur Ausprägung eines pathologischen Bildes, wenn einer der beiden nachfolgenden Kriterien erfüllt ist:

1. Innerhalb der betroffenen Region befinden sich Gene, die der elterlichen Prägung (s. 2.2.1) unterliegen. Durch epigenetische Regulationsmechanismen, wie zum Beispiel der Methylierung eines der beiden Allele, wird die Expression eines geprägten Gens auf einem der beiden Chromosomen unterdrückt. Liegen nun beide homologen Chromosomen von nur einem Elternteil vor, so kommt es zu einer Verdopplung der Dosis von Genen, die normalerweise von dem Allel dieses Elternteils exprimiert werden und zu einer fehlenden Expression von Genen des anderen Elternteils.

Dieser Dosis-Effekt kann demnach zum Beispiel wachstums- und entwicklungsregulierende Prozesse stören.

2. Durch eine UPD kann es zur Ausprägung einer rezessiven Erkrankung kommen, wenn, bedingt durch eine Isodisomie, eine Mutation beim Nachkommen homozygot vorliegt.

Diese Möglichkeit scheint bei SRS-Patienten als Ursache für die Auswirkungen einer UPD(7)mat unwahrscheinlich, da unterschiedlichste Formen der UPD in SRS-Patienten beschrieben und in einer Studie von Preece et al. (1999) keine übereinstimmende isodisome Region bei fünf Fällen mit UPD(7)mat gefunden wurde.

Prinzipiell zeigen Patienten mit einer UPD(7)mat einen milderen Phänotyp als SRS-Patienten mit anderen bekannten genetischen Veränderungen. Während Asymmetrien oder auch Gesichtsdysmorphien abgeschwächt vorzufinden sind, kommt es allerdings zu verstärkten Ernährungsschwierigkeiten in den ersten Lebensjahren und Sprachentwicklungsstörungen sowie zu starkem Schwitzen (Kotzot et al., 2000; Hannula et al., 2001).

Hannula et al. (2001) und Reboul et al. (2005) konnten erstmals neben den vollständigen uniparentalen Disomien solche nachweisen, die ausschließlich einen bestimmten Abschnitt des Chromosoms 7 betreffen. Diese segmentalen maternalen UPDs schließen immer den Bereich 7q31-qter ein, was zu der Postulierung der zweiten Kandidatenregion auf Chromosom 7 für das SRS, neben der Duplikationsregion in 7p, führte. Innerhalb der betroffenen Region sind die beiden geprägten Gene *PEG1/MEST* (*paternally expressed gene 1/mesoderm-specific transcript*; OMIM *601029) und *COPG2* (*coatomer protein complex subunit gamma 2*; OMIM *604355) lokalisiert. Obwohl bisher keine pathogenen Varianten innerhalb dieser beiden Gene in SRS-Patienten detektiert werden konnten (Riesewijk et al., 1998; Blagitko et al., 1999) ist eine Rolle dieser Gene für die Ätiologie des SRS nicht auszuschließen. Bei *PEG1/MEST* handelt es sich um einen paternal exprimierten, mesodermalen Faktor, der an der Regulation von Wachstum und Entwicklung beteiligt ist. Denkbare isolierte Imprinting Mutationen, wie sie für Patienten mit dem „Maternalen UPD14 Syndrom“ beschrieben sind (Temple et al., 2007; Kagami et al., 2008), sind bisher für den *PEG1/MEST* Locus bei SRS-Patienten nicht untersucht. Die wahrscheinlichste Ursache für die Manifestation des SRS bei matUPD(7) ist somit also die Beteiligung geprägter Gene, wobei der Verlust paternal exprimierter, wachstumsfördernder Faktoren oder die Überexpression maternal exprimierter, wachstumshemmender Gene vorstellbar wäre.

2.2.2.2 Chromosom 11

Die Bedeutung des Chromosoms 11 für die Ätiologie des SRS trat erstmals mit der Detektion maternal vererbter Duplikationen in 11p15 bei sechs wachstumsretardierten Patienten in den Vordergrund. Vier dieser Patienten wiesen neben intrauteriner und postnataler Wachstumsrestriktion weitere klinische Merkmale des SRS auf (Kosaki et al., 2000; Fisher et al., 2002; Eggermann et al., 2005). Interessanterweise wird genau diese Veränderung in umgekehrter Form bei Patienten mit dem mit Großwuchs assoziierten Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS) detektiert. Hier findet man paternale Duplikationen genau derselben chromosomalen Region. Für das BWS sind weitere (epi)genetische Modifikationen innerhalb von 11p15 beschrieben, was dazu führte bei Patienten mit SRS nach denselben entgegengesetzten Mutationen in 11p15 zu suchen. Man fand zu dem Syndrom mit der gegensätzlichen Klinik ebenfalls gegensätzliche (epi)genetische Veränderungen.

2.2.2.2.1 Die chromosomale Region 11p15

Bei der chromosomalen Region 11p15 (s. Abb. 2.3) handelt es sich um eine elterlich geprägte Region, deren Gene durch zwei unterschiedlich methylierte Imprintingzentren (ICR1 und ICR2 oder auch *H19*-DMR und *KvDMR1*) reguliert werden (zur Übersicht: Weksberg et al., 2003). Die durch die ICR1 und ICR2 kontrollierten Gene sind vor allem an Prozessen zur Steuerung von Wachstum und Entwicklung beteiligt.

Telomerische Imprinting-Domäne (ICR1)

Die telomerisch gelegene ICR1 dient der Regulation der Gene *IGF2* (*insulin-like growth factor 2*, OMIM *147470) und *H19* (OMIM *103280). Bei *IGF2* handelt es sich um einen Wachstumpromoter, der zur *Insulin-Familie der Polypeptid-Wachstumsfaktoren* gehört und an der Vermittlung der Wachstumshormonwirkung der Zelle beteiligt ist. *IGF2* wird paternal exprimiert. Eine Beteiligung von Mutationen in diesem Gen an der Ätiologie des SRS konnte jedoch ausgeschlossen werden (Obermann et al., 2004).

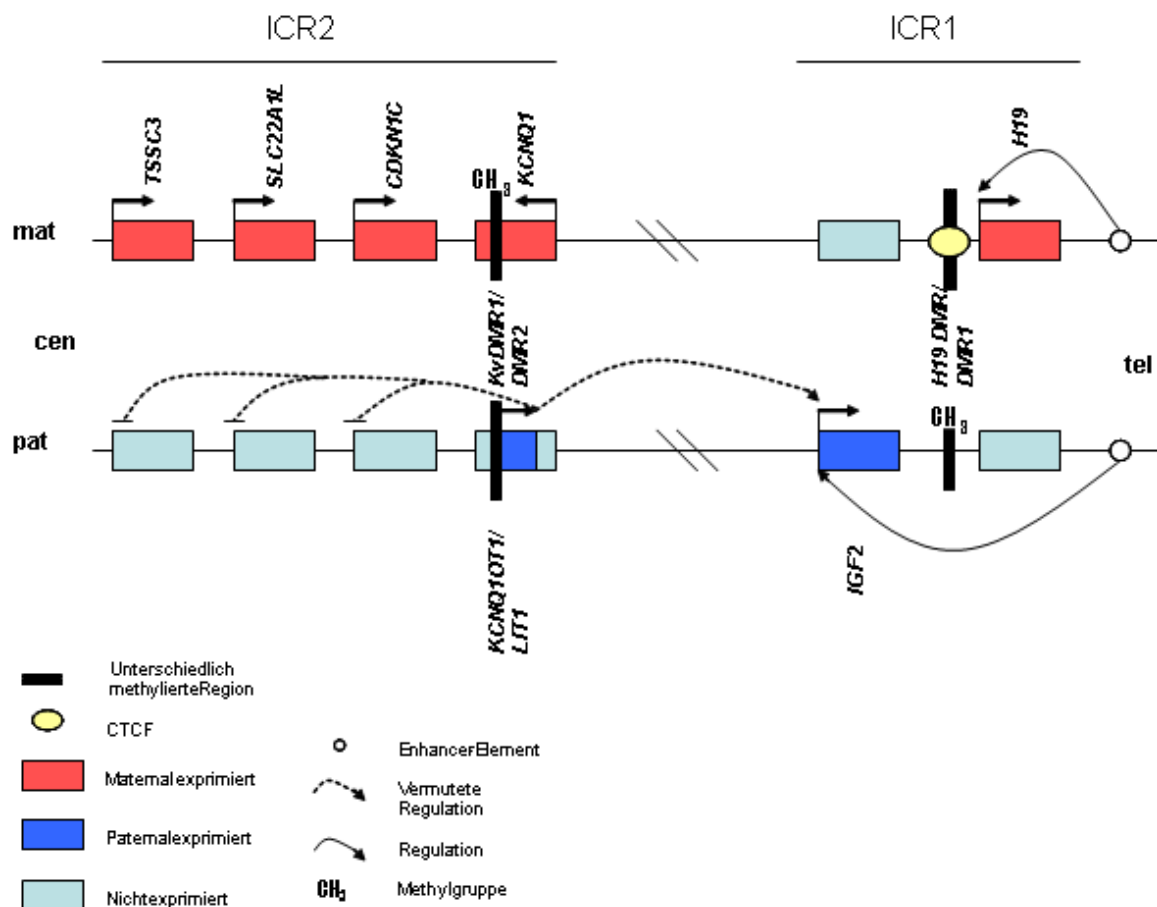


Abb. 2.3: Übersicht der geprägten Region 11p15.5

Die Funktion der maternal exprimierten, untranslatierten Antisense-RNA *H19* ist bisher unbekannt. Sie scheint allerdings eine Tumorsuppressoraktivität zu besitzen. Bei Knockout-Versuchen, bei denen die komplette RNA Sequenz bis auf die regulative Promotersequenz entfernt wurde, zeigte sich keine Auswirkung auf die *IGF2*-Expression (Jones et al., 1998). Somit ist ein direkter Effekt von *H19* auf die *IGF2* Expression widerlegt. Allerdings ist die Sequenz von *H19* relativ stark konserviert. Zusätzlich wurde kürzlich eine microRNA innerhalb von *H19* detektiert, die vermutlich eine Funktion bei der Regulation von mRNAs aufweist (Cai et al., 2007). Eine Beteiligung von *H19* an der Ursache des SRS ist somit vorstellbar.

Die Regulation der Gene in der ICR1 erfolgt über den Mechanismus des *enhancer competition* Modells (Maher et al., 2000), gesteuert durch Methylierung des paternalen Allels und Bindung des Proteins CTCF an die maternale Kopie. Bei CTCF handelt es sich um ein Protein mit diversen Zinkfingerdomänen zur Bindung der DNA an bestimmten Konsensussequenzen. Es dient genomweit der Regulation von Expression und Imprinting

verschiedenster Gene (Kim et al., 2006). CTCF kann methylierungsspezifisch nur an die unmethylierte ICR1 binden, welche 3' von *H19* sieben CTCF-Bindestellen aufweist. Bedingt durch die unterschiedliche CTCF-Bindung der beiden Allele kommt es zur Formierung verschiedener Chromatinstrukturen. Die Bindung von CTCF auf dem maternalen, unmethylierten Allel fördert eine Schleifenbildung, welche ein von der ICR1 telomerisch lokalisiertes Enhancerelement in räumliche Nähe zur *H19*-Promoterregion bringt und somit eine Expression von *H19* bewirkt (s. Abb. 2.3).

Durch die fehlende Bindung von CTCF auf dem paternalen, methylierten Allel formiert sich eine Chromatinstruktur, die das Enhancer-Element in räumliche Nähe zu *IGF2* befördert, sodass auf dem paternalen Allel eine Expression von *IGF2* stattfindet.

Zentromerische Imprintingdomäne (ICR2)

Die centromerisch gelegene ICR2 dient der Regulation von ca. acht geprägten Genen (z.B. *TSSC3*, *TSSC5*, *CDKN1C* und *KCNQ1*). Auch hier findet man ein unterschiedliches Methylierungsmuster der beiden elterlichen Allele, wobei sich die unterschiedlich methylierte Region der ICR2 (DMR2 bzw. KvDMR1) innerhalb des Intron 10 des geprägten Gens *KCNQ1* befindet. Innerhalb dieses Introns ist ebenfalls die Sequenz für die paternal exprimierte, untranslatierte RNA *KCNQ1OT1* oder *LIT1* lokalisiert. Der genaue Mechanismus zur Regulation der Gene innerhalb dieser geprägten Region ist bisher unbekannt. Allerdings wird vermutet, dass entweder die unterschiedliche Methylierung der KvDMR1 selbst oder *KCNQ1OT1* als Mediator des Imprintings dienen (Weksberg et al., 2003). Die ICR2 ist maternal methyliert, wodurch die Expression der untranslatierten RNA *KCNQ1OT1/LIT1* unterdrückt und somit die Expression der anderen geprägten Gene wie *KCNQ1* und *CDKN1C* ermöglicht wird.

Das paternale Allel liegt unmethyliert vor. Hier wird *KCNQ1OT1/LIT1* exprimiert und somit die Expression der restlichen Gene unterdrückt (s. Abb. 2.3).

Bei den beiden für das SRS interessantesten Genen dieser Region handelt es sich um *CDKN1C* und um *KCNQ1OT1/LIT1*. Das *cyclin-dependent kinase inhibitor 1C-Gen* (*CDKN1C*, OMIM *600856) ist ein negativer Regulator der Zellproliferation (Lee et al., 1995), welches maternal expimiert wird. Obwohl Obermann et al. (2004) keine pathogenen Mutationen bei SRS-Patienten innerhalb dieses Gens nachweisen konnten bleibt es dennoch für weitere Untersuchungen zur Ätiologie des SRS von Interesse, da es unter anderem einen direkten Zusammenhang zum BWS zeigt (s. 2.2.2.2.2).

KCNQ1OT1/LIT1 (OMIM *604115) wird in den meisten humanen Geweben vom paternalen Allel exprimiert. Ein Knockout von *Kcnqlot1/Lit1* bei Mäusen verursacht eine Wachstumsretardierung (Fitzpatrick et al., 2002). Allerdings konnten auch in diesem Gen bei SRS-Patienten keine pathogenen Mutationen nachgewiesen werden (Gicquel et al., 2005; Eggermann et al., 2005).

2.2.2.2 Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS)

Beim BWS (OMIM *130650) handelt es sich um ein heterogenes, meist sporadisch auftretendes Fehlbildungssyndrom, welches charakterisiert ist durch einen prä- und postnatalen Großwuchs sowie durch weitere variable Symptome, zu denen vor allem Makroglossie, Bauchwanddefekte und eine Prädisposition für embryonale Tumore zählen (Cooper et al., 2005). Mit 11% ist der Wilms-Tumor die am häufigsten auftretende Krebsform bei Kindern mit BWS, aber auch Hepatoblastome, Rhabdomyosarcome und adrenocorticale Karzinome werden beschrieben (DeBaun et al., 2002).

(Epi)genetische Defekte sind beim BWS bisher nur für die chromosomale Region 11p15 nachgewiesen worden. Bei ca. 70% der Patienten mit BWS kann über die bekannten Defekte in 11p15 der klinische Befund genetisch bestätigt werden (s. Tab. 2.2).

Mit ~50-60% treten am häufigsten Imprintingdefekte innerhalb der centromerischen ICR2 auf. Hier kommt es zu einer meist partiellen Hypomethylierung des normalerweise methylierten maternalen Allels und somit zu einem paternalen Expressionsmuster. Bei ca. 25% der BWS Patienten mit Hypomethylierung der ICR2 konnte nun eine Hypomethylierung weiterer elterlich geprägter Regionen nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um ein übergeordnetes Hypomethylierungssyndrom (Rossignol et al., 2006).

Nur ~5% der Patienten zeigen einen Imprintingdefekt der telomerischen ICR1. Auch hier entsteht ein paternales Expressionsmuster der Gene auf dem maternalen Allel bedingt durch eine Hypermethylierung des normalerweise unmethylierten Allels. Hierdurch kommt es zu einem Verlust des Imprintings (LOI, *loss of imprinting*) von *IGF2* und *H19* und somit zu einer erhöhten *IGF2* bzw. abgeschalteten *H19* Expression. Bei den Patienten mit Hypermethylierung der ICR1 handelt es sich um die oben erwähnten Patienten mit erhöhtem Tumorrisiko. Man vermutet, dass der Verlust der Expression des vermeidlichen Tumorsuppressors *H19* der Grund für dieses erhöhte Risiko ist.

Des Weiteren liegt bei ~10-20% der BWS Fälle eine paternale Isodisomie des Chromosom 11 vor, sodass auch hier die Expression der maternal exprimierten Gene verloren geht.

Ca. 5-10% der sporadischen und ~40% der familiären Fälle weisen eine Mutation des *CDKN1C*-Gens auf.

Chromosomale Umbauten, paternale Duplikationen sowie maternale Inversionen, Translokationen und Mikrodeletionen von 11p15 (Sparago et al., 2004; Niemitz et al., 2004) findet man nur in seltenen Fällen.

Die Inzidenz des BWS liegt bei ~1:12.000 bis 1:15.000.

2.2.2.2.3 Chromosom 11-Befunde beim SRS

(Epi)genetische Veränderungen in 11p15 sind die häufigsten beobachteten Veränderungen beim SRS. Neben Methylierungsdefekten findet man die o.g. maternalen Duplikationen sowie vereinzelte uniparentale Disomien im Mosaik (s. Tab. 2.2).

Epimutationen in 11p15

Bei 38-63% der SRS-Patienten sind Methylierungsdefekte der telomerischen Imprintingregion ICR1 in 11p15 beschrieben (zur Übersicht: Eggermann et al., 2008c). Hierbei wird, bedingt durch eine Hypomethylierung der DMR auf dem paternalen Allel, ein maternales Expressionsmuster der Gene auf beiden Allelen hervorgerufen. Meist liegt eine partielle Demethylierung des paternalen Allels vor, was sich durch einen Verlust der Methylierung nach der Fertilisation erklärt. Diese Mosaikverteilung der Methylierungsmuster ist vermutlich die Ursache für die häufig beschriebenen Asymmetrien bei SRS-Patienten. Man nimmt an, dass sich der SRS-Phänotyp, so wie man es auch für das BWS vermutet, durch eine veränderte *IGF2*-Expression erklärt. In Zellkultur findet man in Fibroblasten von BWS-Patienten eine erhöhte und in SRS-Patienten eine erniedrigte *IGF2* Expression. Im Serum zeigt sich jedoch in beiden Syndromen kein veränderter IGF2-Spiegel. Allerdings liegt in der Leber, welches das Hauptorgan der postnatalen IGF2-Sekretion darstellt, kein *IGF2*-Imprinting vor. Gicquel et al. (2005) fanden bei einem eineiigen Zwillingsspaar einen diskordanten SRS-Phänotyp, obwohl beide eine Hypomethylierung der ICR1 in Lymphocyten aufwiesen. Dieser Befund erklärt sich durch ein Mosaik, da nur bei dem betroffenen Zwilling der molekulargenetische Befund in Fibroblasten der Haut bestätigt werden konnte. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Rolle verschiedener Gewebe und deren Methylierungsstatus für

die Ausprägung eines bestimmten Phänotyps bei gleichen Epimutationen und somit die Auswirkung eines Mosaiks. Kürzlich berichteten Yamazawa et al. (2008) von einem diskordanten eineiigen Zwillingsspaar, von denen ein Kind das SRS bedingt durch eine Hypomethylierung der ICR1 und das zweite Kind einen unauffälligen Phänotyp ohne Methylierungsdefekte aufwies.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich häufig bei der Entstehung von Methylierungsdefekten um einen Fehler nach der Fertilisation handelt, ist die Beobachtung genereller Hypomethylierungssyndrome bei Patienten mit TNDM (*transient neonatal diabetes mellitus*) und BWS (Mackay et al., 2006; Rossignol et al., 2006). Bei Patienten mit TNDM findet man eine Hypomethylierung in 6q24 als eine genetische Ursache. Bei einigen TNDM- und BWS-Patienten, die eine Hypomethylierung in 6q24 bzw. 11p15 aufweisen liegt jedoch zusätzlich eine Hypomethylierung in weiteren elterlich geprägten Regionen vor. Diese Patienten zeigen neben ihren generellen phänotypischen Auffälligkeiten weitere unspezifische Merkmale.

Des Weiteren wird ein Zusammenhang zwischen einem fehlerhaften Imprinting verschiedener Regionen und der assistierten reproduktionsmedizinischen Technik (ART) vermutet. Vor allem für das BWS und das Angelman-Syndrom konnte ein höherer Anteil von Patienten detektiert werden, die nach ART geboren wurden (Orstavik et al., 2003; Maher et al., 2003). Für das SRS ist eine Rolle der ART für die Ätiologie noch ungeklärt, aber auch hier konnten vereinzelt Patienten mit Hypomethylierung nach ART beschrieben werden (Svensson et al., 2005; Kagami et al., 2007). Der zugrunde liegende Mechanismus ist bisher nicht bekannt. Methylierungsdefekte in der centromerischen ICR2 bei Patienten mit SRS wurden bisher nicht beschrieben.

Duplikationen in 11p15

Maternale Duplikationen in 11p15 wurden bisher in nur sechs Fällen mit Wachstumsretardierung berichtet, von denen vier Patienten einen SRS-Phänotyp aufweisen (zur Übersicht: Eggermann et al., 2005). Bei all diesen Fällen schließt die Duplikation die komplette geprägte Region 11p15 mit ein. Da auch bei dieser Aberration die gegensätzliche Veränderung (paternale Duplikation) als Ursache für das BWS in ca. 1% der Fälle nachgewiesen werden kann, unterstützt dies den Zusammenhang zwischen einer maternalen Duplikation und der Ausprägung eines SRS.

In 11p15 konnten für das SRS bisher ausschließlich (epi)genetische Mutationen detektiert werden, die entweder die komplette Region betreffen (z.B. maternale Duplikationen) oder gezielt die telomerische Region ICR1, sodass bisher eine Rolle der telomerischen ICR2 für die Ätiologie des SRS unbestätigt war.

Maternale Uniparentale Disomie 11

Für das BWS können in 10-20% der Fälle paternale Isodisomie11-Mosaik nachgewiesen werden. Kürzlich wurde auch für das SRS der erste Fall eines maternalen Isodisomie11-Mosaiks beschrieben (Bullmann et al., 2008). Somit vervollständigt sich das Bild zweier klinisch und genetisch gegensätzlicher Syndrome. Möglicherweise ist die matUPD(11) eine weitaus häufigere Ursache des SRS als bisher vermutet. Technische Probleme bei der Detektion oder das Vorliegen des Mosaiks in anderen relevanten Geweben als Blut gestalten einen Nachweis jedoch häufig schwierig.

Tab. 2.2: Übersicht über die verschiedenen genetischen Befunde beim SRS und BWS (zur Übersicht: Eggermann et al., 2008a) (* Diese Daten wurden während der vorliegenden Arbeit erhoben.)

Molekulare Veränderungen	BWS	SRS
Strukturelle Umbauten in Chromosom 11	Paternale Herkunft (1-2%)	Maternale Duplikationen (2/46)
UPD11	Paternale UPD11 (10-20%)	Maternale UPD11 (ein beschriebener Fall (Bullmann et al., 2008))
ICR1 Defekte	Hypermethylierung (2-8%)	Hypomethylierung (38-63%)*
ICR2 Defekte	Hypomethylierung (50-60%)	-
	-	Maternale Duplikation (ein beschriebener Fall (Schönherr et al., 2007a))*
	<i>CDKN1C</i> Mutationen (5-10% sporadisch) (40% autosomal dominanter Erbgang)	-
Andere	-	Maternale UPD7/ Maternale Duplikationen in 7p (10%)
	Unbekannt (10-20%)	Unbekannt (<40%)

2.3 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Promotion war der Nachweis und die genauere Charakterisierung (epi)genetischer Veränderungen beim SRS. Hierbei lag ein Schwerpunkt auf den erst kürzlich von Gicquel et al. (2005) beschriebenen Methylierungsdefekten in 11p15.

Zum einen sollte die Häufigkeit dieser epigenetischen Mutationen bei dem zur Verfügung stehenden SRS-Kollektiv mit Hilfe von methylierungssensitiven Methoden ermittelt werden, um eine genauere Aussage zur Relevanz dieser Veränderungen für das SRS treffen zu können.

Des Weiteren war die Untersuchung von Patienten mit isolierter Wachstumsretardierung, ohne weitere SRS-Merkmale vorgesehen, um eine Spezifizierung der Epimutationen in 11p15 für das SRS zu gewährleisten. Hierdurch sollte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der vorliegenden Veränderung um eine Variante handelt, die unspezifisch für das SRS ist und stattdessen auch bei Patienten mit anderen Wachstumsproblematiken auftritt.

Zur genaueren Untersuchung des Methylierungsstatus in 11p15 bei Patienten mit SRS oder isolierter Wachstumsproblematik wurde die neue sogenannte *Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification*-(MLPA) Analyse (MRC-Holland) an unserem Institut etabliert.

Nachdem bei einigen Patienten mit BWS-Phänotyp und Hypomethylierung in der ICR2 und bei Patienten mit transientem, neonatalem Diabetes Mellitus (TNDM) und bekannter Hypomethylierung der chromosomalen Region 6q24 eine generelle Hypomethylierung auch anderer geprägter Loci nachgewiesen wurde (Rossignol et al., 2006; Mackay et al., 2006), stellte sich nun auch die Frage nach einem generellen Hypomethylierungssyndrom bei SRS-Patienten mit Hypomethylierung der ICR1. Zur Klärung dieser Problematik wurde die Methylierungsanalyse weiterer bekannter elterlich geprägter Loci wie 6q24 oder 14q32 vorgesehen.

Auch die genauere Charakterisierung verschiedener Duplikationen in 11p15 bei SRS-Patienten zur besseren Einordnung der Relevanz dieser Kandidatenregionen für das SRS war geplant. Hierzu zählt unter anderem der erste beschriebene Fall einer Duplikation ausschließlich der centromerischen ICR2 in 11p15.

Nachdem im Rahmen einer vorangegangenen Studie (Schönherr et al., 2005), bei drei Patienten mit SRS, Mutationen innerhalb der genomischen Sequenz der untranslatierten RNA *H19* detektiert wurden, sollten weiterführende Analysen zu diesem Kandidatengen in 11p15 angeschlossen werden. Hierzu zählen Splice- und Expressionsanalysen.

Von großem Interesse sind auch die beiden Kandidatenregionen in 7p und 7q. Hier stellte sich unter anderem die Frage nach isolierten Methylierungsdefekten bei SRS-Patienten, nachdem auch für das maternale UPD14-Syndrom solche Auffälligkeiten beschrieben wurden (Temple et al., 2007).

Da alle bisherigen Kandidatenregionen des SRS einer elterlichen Prägung unterliegen ist eine funktionelle Verbindung der Faktoren dieser Regionen denkbar. Zum Nachweis solcher funktioneller Zusammenhänge wurden verschiedene Methoden zum Nachweis möglicher Chromatininteraktion dieser Regionen angewandt. Ähnliche interchromosomale Interaktionen sind bei der Maus (*Mus musculus*) beschrieben (Ling et al., 2006). Denkbar ist allerdings auch eine Expressionsregulation der geprägten Gene innerhalb dieser Regionen durch gemeinsame Faktoren. Transfektionsversuche mit dem Kandidatenprotein CTCF und anschließender quantitativer Untersuchung der Expression verschiedener Zielgene sollten hierzu durchgeführt werden.

Zur Detektion bisher unbekannter SRS-relevanter chromosomaler Regionen war die Etablierung der SNP-Microarray Technologie vorgesehen. Der Nachweis von Duplikationen oder Deletionen mit Hilfe dieses Verfahrens könnte zukünftig genomweit zusätzliche SRS-Kandidatenregionen aufdecken.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Zubehör

Autoklav	HV-85 & HV-25, HD-Tek, Süßen, D
Brutschrank	Kendro, Heraeus, Hanau, D
	Heracell, Heraeus, Kendro, Osterode, D
Elektrophoresegeräte	Pharmacia Gel Elektrophoresis Apparatus GNA-200, Freiburg, D
	Multigel-Long-Gelkammer, Biometra, Göttingen, D
Elektrophoresezubehör	Glasplatten mit fixierten 1,0 mm Spacern; Glasplatten, ausgeschnitten, mit geradem Schliff; Kämme, 24-zählig 1,0 mm; Silikonabdichtung 1,0 mm; Klammern, Biometra, Göttingen, D Gelträger 20x20 cm & 22-Zahn-Kämme, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert, Observer.Z1, Zeiss, Göttingen, D
Geldokumentation	Imaging-System Gel Doc 2000, Bio-Rad, Hercules, USA
Geltrockner	Model 583, Gel-Dryer, Bio-Rad, Hercules, USA
Heizblock	Unitek™ HBS-130/E, peqlab, Erlangen, D Dri-Block® DB3D, Techne, Wertheim, D
Magnetrührer	Ikamag RCT basic, IKA Labortechnik, Staufen, D
Mikrowelle	Bosch
Minishaker	MS1 Minishaker, IKA Labortechnik, Staufen, D
PH-Meter	MP 220 MettlerToledo AG, Schwerzenbach, CH
Photometer	Bio Photometer, Eppendorf, Köln, D
Pipetten & Zubehör	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Villiers-le-Bel, F Pipettenspitzen 10 µl, 20 µl, 200 µl und 1000 µl, Sarstedt, Nümbrecht, D
Reagiergefäße	Certified 0,2 ml 8 Strip StarPCR®, Tubes with Attached Flat Caps, StarLab, Ahrensburg, D

	Reagiergefäß 1,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
	Save-Lock Tubes 0,5 ml, Eppendorf, Hamburg
Real-time Thermocycler & Zubehör	TaqMan™-Instrument, ABI Prism®7000; Skirted Microplates, Starlab GmbH, Ahrensburg, D MicroAmp® Optical caps; Applied Biosystems, Weitersadt, D MicroAmp® Optical tubes; Applied Biosystems, Weitersadt, D Starseal Advanced Polyolefin Film, Microplate Sealing Film, Starlab, Ahrensburg, D
Schüttelapparat	GFL 3015 & GFL 3005, Burgwedel, D Thermoshake TH0500, Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, D
Sequenzierer	ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer, 3130 Genetic Analyzer (4 Capillary), Applied Biosystems, Darmstadt, D
Sequenzierzubehör	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Spannungsgeräte	Electrophoresis Power Supply PS 304, Gibco BRL, Groningen, NL Electrophoresis Power Supply 3002, Gibco BRL, Groningen, NL
Sterilbank	Hera Safe HS12, Kendro, Haraeus, Hanau, D
Thermocycler	PTC 200 DNA Engine MJ Research, Biozym, Hess, Oldendorf, D PTC 100, MJ Research, Biozym, Hess. Oldendorf, D Biometra Personal Cycler, Göttingen, D Primus MWG-Biotech, München, D
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, D
Waagen	BP 2100 & BP 615, Sartorius AG, Göttingen, D
Wasserbad	Lauda E200 ecoline R206, Lauda-Königshofen, D GFL 1086, Burgwedel, D
Whatmanpapier	Whatman Gb002, Schleicher du Schüll, Dassel, D
Vakuumpumpe	Membran-Vakuumpumpe, Vacuubrand, Wertheim, D
Zentrifugen	Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg, D Biofuge fresco, Kendro, Osterode, D Megafuge 1.0R, Sorvall Heraeus, Kendro, Osterode, D

3.1.2 Chemikalien

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

- 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 Startermoleküle (Primer) wurden von der Firma MWG-Biotech AG Ebersberg bezogen und über die Gen-Sequenzen der NCBI-Datenbank ermittelt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). In der vorliegenden Arbeit wurden die Sequenzen gi:3789930 für das Gen *H19*, gi:992945 für *CDKN1C*, gi:89161213 für *PEG1/MEST*, gi:6560937 für *GRB10*, gi:5042384 für *KCNQ1*, gi:146048326 *KCNE1* und gi:62952500 *CTCF* verwendet. Primersequenzen für die Mikrosatelliten-Analyse entsprechen den Angaben der UCSC-Datenbank (<http://genome.ucsc.edu>). Die Sequenzen der verwendeten Primern können den Tabellen in 6. Anhang entnommen werden.

3.1.4 Feinchemikalien und Enzyme

Plazentare RNA

Human Placental Total RNA, Clontech, CA, USA

COT-DNA	COT Human DNA, Roche, Mannheim, D
DNase	RNase-Free DNase-Set (50), QIAGEN, Hilden, D
Bisulphit-Behandlungs Kit	EZ DNA Methylation-Gold™, Zymo Research, CA, USA
DAPI-Fertigmedium	DAPI II (125 ng/ml), Abbott Molecular, Illinois, USA
FISH-Kit	FISH Tag™ DNA Multicolor Kit Alexa Fluor® dye combination, Invitrogen, Karlsruhe, D
Gelextraktionskit	QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Hilden, D
Längenstandard	100 bp-Leiter & 50 bp-Leiter, 1 µg/µl, Invitrogen, Karlsruhe, D
Ligase	T4 DNA Ligase, Promega, Mannheim, D 10x T4 DNA Ligase, New England Biolabs, Frankfurt/Main, D
MLPA-Kit	Salsa reagents for MLPA® reactions, ME030-B1 BWS, MRC Holland, Amsterdam, NL
Microarray	Affymetrix GeneChip® Human Mapping 500K Assay; GeneChip® Mapping 250K Assay Kit Nsp; GeneChip® Mapping 250K Assay Kit Nsp, Affymetrix, CA, USA GC-Melt (5 M); TITANUM™ Taq DNA Polymerase, Clontech, CA, USA
Nukleotide	(dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Je 100 mM, Invitrogen, Karlsruhe, D
Nick-Translationskit	BioNick™ Labeling System, Invitrogen, Karlsruhe, D
PCR-Reinigungs kit	QIAquick® PCR Purification Kit (250), QIAGEN, Hilden, D ExoSAP-IT®, USB, Cleveland, USA
Plasmid-Isolationskit	Large-Construct Kit (10), QIAGEN, Hilden, D QIAprep Spin Miniprep Kit (50), QIAGEN, Hilden, D
Protease Inhibitor	Protease Inhibitor Cocktail „general use“, SIGMA, Dreisenhofen, D
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
RNase	RNase A (100 mg/ml), QIAGEN, Hilden, D
RNA-Isolationskit	QIAamp® RNA Blood Mini Kit, QIAGEN, Hilden, D

RT-PCR Kit	Reverse Transcription System, Promega, Mannheim, D
Sequenzierkit & benötigte Reagenzien	ABI Prism [®] Big Dye [™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit; Gene Scan-500LIZ Size Standard; HiDi [™] Formamide, Applied Biosystems, Weiterstadt, D
TOPO TA Cloning [®] Kit	Invitrogen, Karlsruhe, D
<i>Taq</i> -Polymerase	<i>Taq</i> DNA Polymerase, QIAGEN, Hilden, D <i>Taq</i> PCR ^x DNA Polymerase, recombinant ; Hot Star <i>Taq</i> -DNA Polymerase 5 U/μl; AccuPrime [™] <i>Taq</i> DNA Polymerase High Fidelity, Invitrogen, Karlsruhe, D Ampli Taq [®] Polymerase with 10x PCR Buffer II, Applied Biosystems, Weiterstadt, D
Transfektionsreagenz	Lipofectamine [™] 2000 Reagent, Invitrogen, Karlsruhe, D

3.1.5 Materialien und Reagenzien für die Zellkultur

Ampicillin	Ampicillin Natriumsalz 99% für die Molekularbiologie, Roth, Karlsruhe, D
Cyclosporin A	5 mg, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
DMSO	Dimethylsulfoxid, Merck, Darmstadt, D
EBV-Stammkultur	B95 8 Marmoset-Affen-Zelllinie
Falcons	50 ml, steril, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Fötales Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe, D
Fungizone/Amphotericin B	250 μg/ml, ICN Biomedicals, Ohio, USA
Glutamin	250 mM, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, D
IPTG	IPTG ≥99%, Dioxanfrei, Roth, Karlsruhe, D
Kulturflaschen	50 ml, 25 cm ² , Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Kulturmedium	RPMI 1640 Medium, 500 ml, Gibco BRL; DMEM + Glutamax [™] 1x, Gibco BRL; OPTI-MEM [®] I 1x, Gibco BRL; Amniomax [™] II, Gibco BRL, Groningen,

	NL
Kulturschalen	Petrischalen 92x16 mm mit Nocken, Sarstedt, Nümbrecht, D
	Tissue Culture Dish 100x20 mm, Sarstedt, Nümbrecht, D
Nunc-Röhrchen	1 ml Cryotubes, Nunc GmbH, Wiesbaden, D
Penicillin/Streptomycin	10.000 µg/ml, Biochrom, Berlin, D
Pipetten	2 ml, 5 ml, 10 ml, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Trypsin	.05% Trypsin-EDTA 1x, Gibco BRL, Groningen, NL
X-Gal	UltraPure™ X-Gal, Invitrogen, Karlsruhe, D

3.1.6 Bakterienstämme, Plasmide und Zelllinien

3.1.6.1 Bakterienstämme

Tab. 3.1: Verwendete, chemisch kompetente Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
JM109	e14–(McrA–) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK– mK+) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZΔM15]	Promega, Mannheim, D
One Shot® TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen, Karlsruhe, D

3.1.6.2 Plasmide

Tab. 3.2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Verwendung/Resistenz	Hersteller
pCR [®] 2.1	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor/ Kan ^r Amp ^r	Invitrogen
pcDNA [™] 5/FRT/TO	Eukaryotischer Expressionsvektor/ Amp ^r	Invitrogen
PTargeT [™]	Eukaryotischer TA-Expressionsvektor/ Amp ^r	Promega

Tab. 3.3: Verwendete Klone von RZPD/Imagenes zur FISH-Analyse bzw. *CTCF*-Klonierung

RZPD-Klon	Insert	Gen	Vektor	Stamm	Verwendung
RZPDB737B082188D6	RP11-832D10	<i>GRB10</i>	pBACe3.6	<i>E.coli</i> DH10B	FISH
RZPDB737C052001D6	RP11-2E11	<i>MEST</i>	pBACe3.6	<i>E.coli</i> DH10B	FISH
RZPDB737F022085D6	RP11-295K3	<i>H19</i>	pBACe3.6	<i>E.coli</i> DH10B	FISH
IRAUp969H0450D	BC014267	<i>CTCF</i>	pOTB7	<i>E.coli</i> DH10B	<i>CTCF</i> - Klonierung

3.1.6.3 Zelllinien

Tab. 3.4: Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Zelltyp	Herkunft
Cos7	Epithelzellen aus der Niere der grünen Meerkatze	Institut für Biochemie; RWTH Aachen
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen, epithelien- und fibroblastenartig	Institut für Biochemie; RWTH Aachen

3.1.7 Probanden-Kollektive

Das in der Arbeit verwendete Patientenkollektiv setzte sich zusammen aus:

- a) 72 SRS-Patienten, bei denen in Zusammenarbeit mit der Universitätskinderklinik Tübingen ein charakteristischer SRS-Phänotyp nach den Kriterien von Wollmann et al. (1995) ermittelt wurde.
- b) 188 kleinwüchsigen Patienten mit Verdacht auf SRS, die aus der laufenden Routinediagnostik rekrutiert wurden.
- c) 30 Patienten mit isolierter intrauteriner (IUGR) und postnataler Wachstumsretardierung (PGR), die in Zusammenarbeit mit NovoNordisk Pharma GmbH gesammelt wurden, sowie 20 Patienten mit isolierter IUGR und 58 Patienten mit Wachstumsretardierung und weiteren klinischen Auffälligkeiten, die nicht mit dem SRS assoziiert sind. Diese Patienten wurden aus laufenden Studien der Universitätskinderklinik Tübingen bezogen.

-
- d) Als Kontrollen dienten: normalwüchsige Kontrollen, zwei SRS-Patienten mit maternaler Duplikation in 11p15 (SR46K und SR90K) sowie ein BWS-Patient mit Hypomethylierung der ICR2.

Zur Durchführung der beschriebenen Analysen standen die genomischen DNA-Proben des Kollektivs bereits zur Verfügung und wurden zuvor mittels Aussalzverfahren nach Miller et al. (1988) aus Lymphozyten des peripheren Blutes isoliert.

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

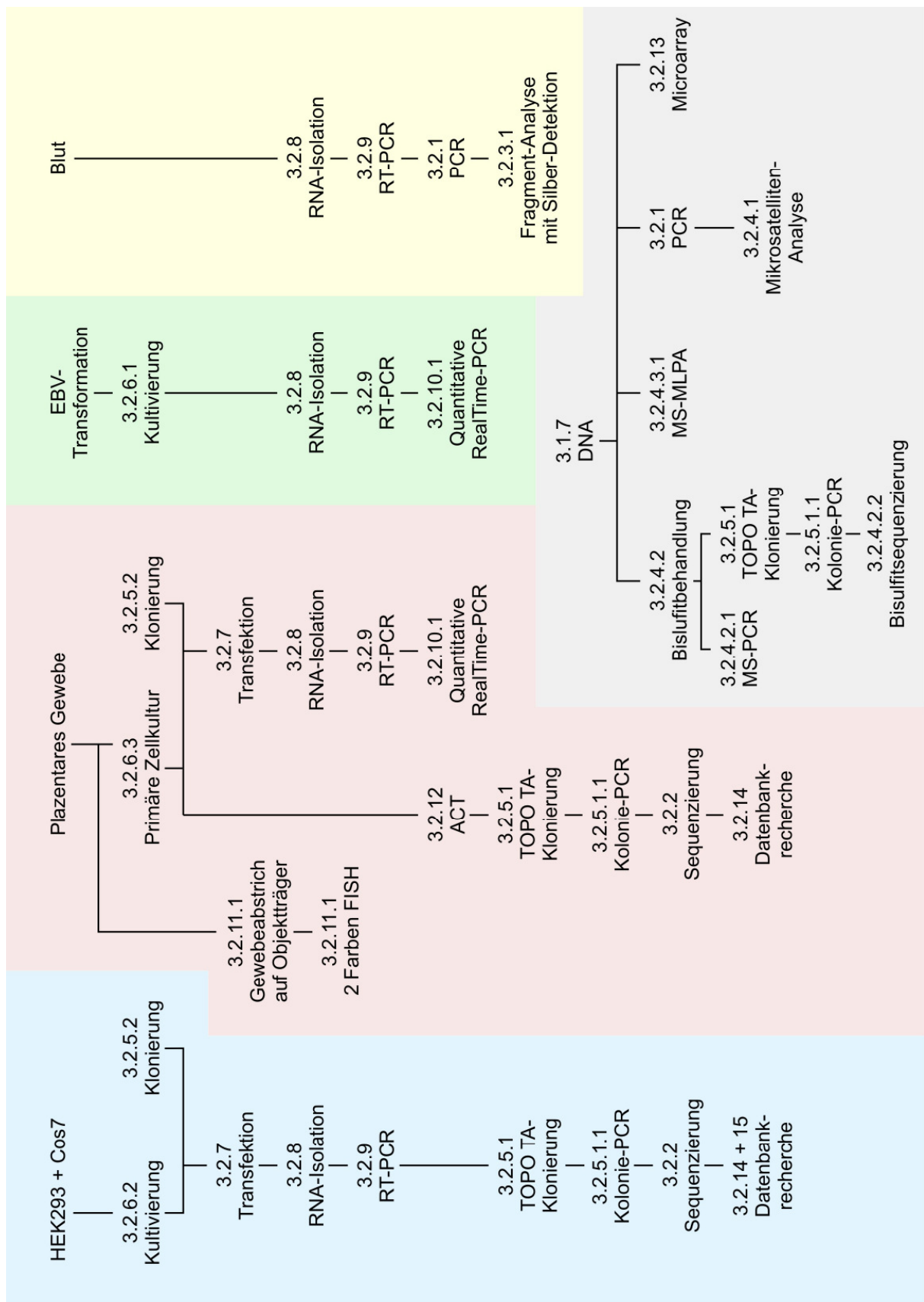


Abb. 3.1: Arbeitsabläufe der in der vorliegenden Studie durchgeführten Untersuchungen. Im nachfolgenden Kapitel 3.2 erfolgt eine detaillierte Erläuterung der dargestellten Methoden.

3.2 Methoden

3.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction)

In der vorliegenden Arbeit ist die Grundlage der meisten durchgeführten Methoden die PCR-Amplifikation der zu analysierenden Fragmente. Hierbei dient die hitzeresistente *Taq*-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* als katalysierendes Enzym. Des Weiteren werden Startermoleküle (Primer) benötigt, die zu den jeweiligen Enden der zu amplifizierenden Sequenz komplementär sind. Entsprechend der DNA-Matrize baut die Polymerase die vier desoxy-Nukleotid-tri-phosphate (dNTPs) als Bausteine in die wachsende Nukleotidkette ein und erstellt somit eine Kopie der Sequenz. Während der PCR wiederholen sich zyklisch drei Reaktionsschritte, die mit unterschiedlichen Temperatur-Abfolgen verbunden sind. Hierbei handelt es sich um einen Denaturierungs-, einen Annealing- und einen Elongationsschritt. Durch viele aufeinander folgende Zyklen, bei denen die neu synthetisierten Stränge ebenfalls als Matrize dienen, kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des Produktes.

In dieser Studie wurde die *Taq* PCRx DNA Polymerase recombinant von Invitrogen nach Herstellerangaben als Standard-PCR verwendet.

Erfolgt keine eindeutige Produktion des Zielfragments, können die PCR Bedingungen modifiziert werden. Hierbei spielt die Modifizierung der Annealing Temperatur (T_A) und der $MgCl_2$ -Konzentration eine große Rolle. Zur Vervielfältigung von Fragmenten, die bei Verwendung der Standard-PCR keine Amplifikation erzielten, wurden je nach Problematik speziellere Polymerasen und PCR-Kits nach Herstellerangaben verwendet.

PCR-Bedingungen und Primer können den Tabellen im Anhang (Kapitel 6) entnommen werden. Zur Kontrolle der Spezifität der PCR erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der Produkte nach ihrer Größe in einem 1%igen Agarose-Gel.

Genauere Angaben zur Durchführung einer PCR und der elektrophoretischen Auftrennung von PCR Produkten in Agarose-Gelen können den Ausführungen in Schönherr (2005) entnommen werden.

3.2.2 Direkte Sequenzierung nach Sanger

Bei der direkten Sequenzierung handelt es sich um einen direkten Mutationsnachweis, der eine genaue Charakterisierung von Sequenzveränderungen zulässt. Hierbei kann es sich um Veränderungen innerhalb der Basenzusammensetzung oder Nukleotidanzahl handeln.

Mit Hilfe einer Sequenzierung kann die genaue Nukleotidabfolge eines Fragmentes ermittelt werden, sodass die Detektion unbekannter Basen-Austausche, -Verluste oder -Zugewinne möglich ist. Die verwendete Methode nach Sanger beruht auf einer Kettenabbruch-PCR mit der Verwendung von didesoxy-Nukleotiden. Bei Einbau eines 2',3',-Didesoxynukleotids (ddNTP) während der Sequenzier-PCR erfolgt ein Abbruch der Reaktion nach dieser Base aufgrund der fehlenden 3'OH-Gruppe der ddNTPs. Das Verhältnis zwischen dNTPs und ddNTPs ist genauestens abgestimmt, sodass durch die statistisch verteilten Unterbrechungen der Komplementärstrang-Synthese Fragmente jeder möglichen Länge entstehen, die jeweils um ein Nukleotid verkürzt sind. Die vier verwendeten ddNTPs sind unterschiedlich fluoreszenzmarkiert. Bei einer anschließenden Längenauftrennung der Sequenzierprodukte, bei der Längendifferenzen von 1 bp unterschieden werden können, kann an jeder Position eine markierte Base durch einen Laser detektiert und somit die Basenabfolge bestimmt werden. Die Basensequenz wird anschließend in Form eines Elektropherogramms dargestellt.

Verwendete Reagenzien für die Fällungsreaktion

3M Natriumacetat (NaCH_3CO_2) (pH 4,8)	10 μl
100% Ethanol eisgekühlt ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	250 μl
70% Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	500 μl
PCR-Produkt der Sequenzierreaktion	10 μl
HPLC-Wasser	80 μl

Durchführung

Das zu sequenzierende PCR-Produkt wurde zunächst aufgereinigt. Hierzu wurde das Reagenz ExoSAP-IT[®] der Firma USB nach Herstellerangaben verwendet. Dieses beinhaltet eine Exonuclease I, welche den enzymatischen Verdau einzelsträngiger DNA von 5' nach 3' katalysiert. Somit erfolgt ein Abbau überzähliger Primer-Moleküle nach der PCR.

Zur Durchführung der Sequenzier-Reaktion wurden diesem gereinigten Produkt nun 1 μl des benötigten Primers und 1,5 μl des Terminator Ready Reaction Mixes, des ABI Prism BigDye-

Terminator Cycle Sequencing Reaction Kits der Firma ABI, hinzugefügt. Die Sequenzierreaktion erfolgte bei folgendem Standard-Protokoll:

1.) 96°C	10 sec	} 26x
2.) 55°C	5 sec	
3.) 60°C	4 min	

Das entstehende PCR-Produkt wurde im Anschluss an die Reaktion in einer Ethanol-Fällung aufgereinigt. Hierzu wurde das Sequenzierprodukt mit 80 µl HPLC-Wasser, 10 µl Natriumacetat und 250 µl absolutem Ethanol gemischt, für 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einem zweiten Waschschrift mit 500 µl 70%igem Ethanol für 10 min bei 14.000 rpm wurde der Überstand erneut entfernt. Das DNA-Pellet wurde getrocknet, um es danach in 20 µl Hi-Di™ Formamid (ABI) zu lösen. 10 µl des Produktes wurden zur Analyse auf dem Kapillar-Sequenzierer AB3130 verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Sequencing-Analysis 5.2-Software der Firma Applied Biosystems.

3.2.3 Fragment-Analyse

Bei der Fragment-Analyse handelt es sich um eine Methode zur Längenbestimmung eines DNA-Fragments welches z.B. mittels PCR (s. 3.2.1) oder Restriktionsverdau (s. 3.2.5.4.1.1) erzeugt wurde. Dieses Verfahren beruht auf der Auftrennung negativ geladener DNA innerhalb eines unterschiedlich stark vernetzten Gels durch das Anlegen einer Spannung. Da in den meisten Fällen eine genaue Analyse der Fragmentlänge notwendig ist, nutzt man die hoch auftrennenden Eigenschaften von Polyacrylamid-Gelen (PAA-Gelen). Je nach Acrylamid-Konzentration und Dicke der Gele ist eine Auftrennung von bis zu 1 bp Genauigkeit möglich. PAA-Gele bestehen aus einer Mischung von Acrylamid und Bisacrylamid, die mittels radikalischer Polymerisation einen hohen Vernetzungsgrad erzielen. Bei der Polymerisations-Reaktion diente Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Katalysator.

3.2.3.1 Fragment-Analyse mit Silber-Detektion

Zur Detektion von DNA-Fragmenten in PAA-Gelen stellt die Silberfärbung eine gute Alternative dar, da sie weder zeitaufwendig noch teuer ist und eine geringe Toxizität aufweist. Bei dieser Methode findet eine Komplexierung von Silber-Ionen an der DNA statt. Alkalisches Formamid reduziert anschließend die Silber-Ionen, wodurch das Silber ausfällt und die DNA als Bande im Gel sichtbar wird (Budowle et al., 1991).

Zusammensetzung eines 10%igen PAA-Gels

Acrylamid	(40%)			4,9 ml
Bisacrylamid	(2%)			2 ml
Tris-HCl	(1,0 M)	50 mM	0,5x TBE	ad 20 ml
Borsäure	(0,9 M)	45 mM		
EDTA	(0,01 M)	0,5 mM		
TEMED		0,05%		0,02 ml
10% APS				0,25 ml
Glycerol		5%		1 ml

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

Verwendete Reagenzien für die Silberfärbung

Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	10%
Salpetersäure (HNO ₃)	1%
Silbernitrat (AgNO ₃)	0,2%
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	3%
Formaldehyd (CH ₂ O)	0,05% in Na ₂ CO ₃

Essigsäure (CH₃COOH) 10%

Aqua dest.

Durchführung

Zunächst wurden die aufgeführten Reagenzien zur Herstellung eines 10%igen PAA-Gels gemischt. Mit Zugabe von APS beginnt das Gel auszupolymerisieren und wurde deshalb zügig zwischen zwei Gasplatten mit einem fixierten 0,4 mm Abstandhalter gegossen. In die obere Kante wurde ein 24-zähliger Kamm eingesetzt, welcher als Platzhalter für die Taschen der aufzutragenden Proben diente. Bei Raumtemperatur (RT) polymerisierte das Gel innerhalb einer Stunde aus. Nach dem Entfernen der Silikonabdichtungen wurden die Gele in das Elektrophoresegerät eingespannt und die Pufferkammer mit 0,5x TBE-Puffer gefüllt. 5 µl der Proben wurden mit 5 µl Agarose-Blaupuffer versetzt. Von diesem Proben-Puffer-Gemisch wurden jeweils 8 µl pro Gel sowie zusätzlich eine 100 bp-Leiter zur Orientierung aufgetragen. Die Gele liefen bei RT und 180 V für 3 –4 Stunden. Nach Beenden der Gelelektrophorese wurden die PAA-Gele zwischen den Platten entfernt und in einer Färbewanne mit 10%igem Ethanol 10 min geschüttelt, um die DNA im Gel zu fixieren. Anschließend erfolgte eine Ansäuerung der Gele für 10 min mit 1%iger Salpetersäure, wodurch eine Anlagerung der Silber-Ionen an die DNA ermöglicht wurde. Zur Komplexierung der Silber-Ionen mit der DNA wurde das Gel für 30 min mit 0,2%igem Silbernitrat behandelt. Drei kurze Waschschriffe mit Aqua dest. folgten zur Entfernung der überschüssigen Silber-Ionen. Zur Darstellung der DNA wurde mit Natriumcarbonat und Formaldehyd entwickelt. Ein Abstoppen der Reaktion fand durch das Zufügen von 10%iger Essigsäure statt, sobald die Banden deutlich genug zu erkennen waren. Zum Schluss wurden die Gele noch einmal mit Aqua dest. gewaschen, auf Whatmanpapier aufgezogen und für 3-4 Stunden auf dem Vakuumtrockner getrocknet.

Diese Methode wurde in der vorgestellten Studie zur Expressionsanalyse der Gene *H19* bei Familie SR93 und *CDKN1C* bei Familie FN auf cDNA-Ebene verwendet. Primer und PCR-Bedingungen sind in den Tabellen 6.1 und 6.2 (s. 6. Anhang) aufgeführt.

3.2.3.2 Fragment-Analyse mit Fluoreszenz-Markierung

Bei der Fragment-Analyse mit Fluoreszenz-Markierung ermöglicht die Verwendung eines automatischen Analysegerätes (AB3130) die Bestimmung der Intensität der

fluoreszenzmarkierten Fragmente. Nach Auftrennung der PCR-Produkte ist eine genaue Quantifizierung und somit der Vergleich verschiedener Fragmente sowie die Bestimmung ihrer Kopienzahl, wie z.B. bei der Mikrosatelliten Analyse (s. 3.2.4.1), möglich.

Die Markierung der Fragmente erfolgt während der Amplifikation durch Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Primers. Wie bei der Sequenzierung (s. 3.2.2) wird die Fluoreszenz mit Hilfe eines Lasers angeregt, über eine CCD-Kamera registriert und mit der entsprechenden Software ausgewertet.

Durchführung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fragment-Analyse mit Fluoreszenz-Markierung vor allem bei der Mikrosatelliten-Analyse (s. 3.2.4.1) zur Kopienzahl-Bestimmung durchgeführt. Des Weiteren diene sie dem Nachweis einer UPD(7)mat bei der Methylierungsspezifischen-PCR (s. 3.2.4.2.1).

Nach Amplifikation des Zielfragments mit fluoreszenzmarkierten Primern wurde das Produkt auf einem Agarosegel getestet. 1 µl des PCR-Produktes wurde mit 8,5 µl Hi-Di™ Formamid und 0,5 µl LIZ-Standard verdünnt. Anschließend wurden die Proben auf dem automatischen Sequenzierer AB3130 aufgetrennt und mit der GeneMapper v4.0-Software analysiert.

3.2.4 Nachweis von Epimutationen und UPDs

Zum Nachweis von Mutationen, die nicht auf Veränderungen innerhalb der Basensequenz beruhen, sondern auf epigenetischer Ebene vorliegen, ist die Anwendung vielfältiger Methoden möglich. Man unterscheidet hierbei die Mikrosatelliten-Analyse, die dem Nachweis Uniparentaler Disomien dient, von Verfahren, die mit Hilfe von bisulphitbehandelter DNA den genauen Methylierungsgrad bestimmt.

3.2.4.1 Mikrosatelliten-Analyse

Der Nachweis einer UPD wurde u.a. mit Hilfe von Mikrosatelliten-Analysen durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Längenbestimmung hoch repetitiver, polymorpher Sequenzen, die über das gesamte Genom verteilt vorliegen. Durch die Analyse dieser Polymorphismen bei einem Patienten und dessen Eltern ist es möglich, die elterliche Herkunft zweier Allele und somit z.B. eine UPD zu bestimmen.

Durchführung

Bei der Analyse von Mikrosatelliten wird zunächst eine PCR (s. 3.2.1) mit markierten Primern durchgeführt, die flankierend zu der repetitiven Sequenz des Mikrosatelliten lokalisiert sind. Die weitere Durchführung entspricht dem Protokoll der Fragment-Analyse mit Fluoreszenz-Markierung (s. 3.2.3.2). Die verwendeten Primer und Mikrosatelliten sind in Tabelle 6.3 (s. 6. Anhang) aufgelistet.

3.2.4.2 Bisulphitbehandlung

Die Bisulphitbehandlung von DNA ist die Ausgangsmethode verschiedenster Anwendungen zum Nachweis und zur Quantifizierung von DNA-Methylierung.

Bei diesem Verfahren erfolgt durch Behandlung der DNA mit Natriumbisulphit eine Deaminierung nicht-methylierter Cytosine zu Uracil. Aufgrund einer Schutzfunktion der Methylgruppe bleiben methylierte Cytosine unverändert. Somit ergibt sich eine Sequenzänderung des unmethylierten Allels, wodurch eine Unterscheidung unterschiedlich methylierter Allele möglich wird.

Durchführung

Die Bisulphitbehandlung der DNA wurde nach Angaben des Herstellers mit dem EZ DNA Methylation-Gold KitTM der Firma Zymo Research durchgeführt.

Zunächst werden 500 ng DNA in 20 µl Aqua dest. Gelöst und mit 130 µl eines CT Conversion Reagents versetzt, das die benötigten Chemikalien zur Konvertierung der unmethylierten Cytosine beinhaltet. Nach einer kurzen Denaturierung der DNA findet die Reaktion bei 53°C statt. Hierzu wurde folgendes Programm im Thermocycler, nach Zugabe des CT Conversion Reagent, durchgeführt:

- | | | | |
|----|------------------|------|-------|
| 1. | 10 min | 98°C | |
| 2. | 30 min | 53°C | } 8 x |
| 3. | 6 min | 53°C | |
| 4. | 30 min | 37°C | |
| 5. | 4°C zur Lagerung | | |

Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der behandelten Proben über DNA-bindende Ionenaustauscher-Säulen mit im Kit enthaltenen Puffern. Nach einer Elution der DNA von diesen Säulen mit Hilfe eines Elutionspuffers erhält man 10 µl bisulphitbehandelter DNA, die für weiterführende Analysen wie zum Beispiel einer PCR verwendet werden können.

3.2.4.2.1 Methylierungsspezifische-PCR (MS-PCR)

Bei der MS-PCR erfolgt die Amplifikation eines DNA-Fragmentes in Abhängigkeit seines Methylierungszustandes. Diese Unterscheidung wird durch den Einsatz bisulphitbehandelter DNA und spezifisch ausgewählter Primer ermöglicht. Nach Konvertierung unmethylierter Cytosine zu Uracil mittels Bisulphitbehandlung (s. 3.2.4.2) und daraus resultierender Veränderung der Sequenz des unmethylierten Allels werden Primer verwendet, die entweder gegen die veränderte oder die unveränderte Sequenz der Zielregion gerichtet sind. Somit ist eine selektive Amplifikation des methylierten oder unmethylierten Fragmentes möglich.

3.2.4.2.1.1 MS-PCR für Chromosom 7

Die MS-PCR für das Chromosom 7 kann zum Nachweis uniparentaler Disomien des Chromosoms 7 und isolierter Veränderungen des Methylierungszustandes innerhalb der Region 7q32 verwendet werden.

Die methylierungsspezifischen Primer für diese Analyse sind innerhalb der unterschiedlich methylierten Region 7q32 lokalisiert, welche unter anderem die Expression des elterlich geprägten Gens *PEG1/MEST* reguliert. Primersequenzen und verwendetes Protokoll liegen den Angaben von Moore et al. (2005) zugrunde. Es handelt sich hierbei um eine Multiplex-PCR. Dies bedeutet, dass mehrere Primer für verschiedene Fragmente innerhalb eines Reaktionsansatzes verwendet werden. Bei der MS-PCR für 7q32 wird ein gemeinsamer fluoreszenzmarkierter Rückwärts-Primer verwendet, der methylierungsunabhängig an beide Allele bindet. Des Weiteren befinden sich in der Reaktion zwei Vorwärts-Primer, die in geringem Abstand voneinander lokalisiert sind und von denen einer zum methylierten, unveränderten Allel und der andere zum unmethylierten, veränderten Allel komplementär ist. Somit erfolgt in nur einer PCR-Reaktion die Amplifikation der Fragmente beider Allele, die sich minimal in ihrer Länge unterscheiden. Je nachdem ob eine Hypo- oder

Hypermethylierung bzw. eine Uniparentale Disomie vorliegt erhält man quantitative Unterschiede der beiden PCR-Produkte.

Diese werden in einer anschließenden Auftrennung der beiden Fragmente sowohl über die Agarose-Gelelektrophorese als auch zur genaueren quantitativen Analyse über die Sequenziergelelektrophorese des AB3130 Sequenzierers aufgetrennt. Die Intensität der Banden bzw. der Peaks gibt Aufschluss über den Methylierungsgrad bzw. das Vorliegen nur einer der beiden elterlichen Allele. Bei auffälligem Befund erfolgt eine Unterscheidung eines Methylierungsdefektes von einer UPD mit Hilfe der Mikrosatelliten-Analyse (s. 3.2.4.1). Finden sich auch hier nur die Allele eines Elternteils kann ein isolierter Methylierungsdefekt der Region ausgeschlossen werden.

Durchführung

Zunächst erfolgte eine Bisulphitbehandlung (s. 3.2.4.2) der eingesetzten DNA. Von dieser DNA wurden 4 µl in die nachfolgende PCR (Primerangaben s. Tab. 6.6 in 6. Anhang) eingesetzt. Folgendes PCR-Programm wurde durchgeführt:

1.	5 min	95°C	
2.	30 sec	95°C	} 40 x
3.	1 min	63°C	
4.	1,5 min	72°C	
5.	10 min	72°C	

Anschließend wurde das PCR-Produkt auf einem 1 %igen Agarosegel bei 140 V für 30 min aufgetrennt. Das maternale, methylierte Allel erzeugt ein Fragment mit einer Länge von 104 bp und das paternale unmethylierte Allel mit 187 bp.

Um eine genauere Quantifizierung schwächer amplifizierter Fragmente zu ermöglichen, wurden die Proben mit Hilfe der automatischen Sequenziergelelektrophorese auf dem AB3130 analysiert.

3.2.4.2.1.2 MS-PCR für Chromosom 6 und Chromosom 14

Die MS-PCR für die Chromosomen 6 und 14 wurde zur Identifizierung allgemeiner Hypomethylierungen bei SRS-Patienten durchgeführt. Die Protokolle zur Durchführung

dieser Analysen lagen den Angaben von Mackay et al. (2005) und Temple et al. (2007) zugrunde. Hierbei wurde für die beiden chromosomalen Regionen jeweils eine Multiplex-PCR (s. 3.2.4.2.1.1) durchgeführt. In beiden Fällen wurden ein gemeinsamer methylierungsunabhängiger Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer, sowie zwei methylierungsspezifische Primer zur Amplifikation benötigt. Die verwendeten Primer und PCR-Bedingungen sind in Tabelle 6.7 (s. 6. Anhang) aufgeführt. Bei beiden PCRs wurde das Hot Star *Taq*-DNA Polymerase-Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1 %igen Agarosegel bei 140 V für 30 min getestet. Für Chromosom 6 erzeugte das maternale, methylierte Allel ein Fragment mit einer Länge von 175 bp und das paternale unmethylierte Allel eines mit 188 bp. Bei Chromosom 14 stellt ein Fragment von 193 bp das paternale, methylierte und ein Fragment von 221 bp das maternale unmethylierte Allel dar.

Eine genaue Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der automatischen Sequenzierелеktrophorese auf dem AB3130.

3.2.4.2.2 MS-PCR zur Bisulphit-Sequenzierung

Zur genauen Bestimmung des Methylierungszustandes jeder einzelnen Base eines Zielfragmentes kann eine Sequenzierung bisulfitbehandelter DNA durchgeführt werden. Hierbei werden für die MS-PCR Primer ausgewählt, die komplementär zu angrenzenden Bereichen des Zielfragmentes sind und keine CpGs enthalten. Da nur solche Cytosine methyliert vorliegen können, denen ein Guanin in der Sequenz nachfolgt, kann man in Bereichen ohne CpGs eine vollständige Konvertierung aller Cytosine zu Uracil voraussetzen und dementsprechend komplementäre Primersequenzen auswählen.

Anschließend erfolgt eine TOPO-TA Klonierung (s. 3.2.5.1) der PCR-Fragmente in TA-Vektoren und eine Transformation in kompetente *E. coli*. Man erzielt hierdurch die Vereinzelung der während der PCR entstandenen Produkte und somit der verschiedenen Zustandsformen von Methylierungsmustern des Zielfragmentes. Eine Kolonie-PCR (s. 3.2.5.1.1) eines Klons ermöglicht die Amplifikation genau eines PCR Fragmentes. Mit nachfolgender Sequenzier-PCR kann diese Sequenz dann ermittelt werden. In einer Sequenzierung mit dem Vorwärts-Primer stellt sich ein unmethyliertes Cytosin als Thymin und ein methyliertes Cytosin als Cytosin dar. Durch die Sequenzierung mehrerer Kone einer

PCR kann somit das Verhältnis methylierter zu unmethylierter Cytosine eines ganzen Fragmentes bestimmt werden.

Durchführung

Zunächst erfolgte eine Bisulphit-Behandlung (s. 3.2.4.2) der zu sequenzierenden DNA. Anschließend wurden eine PCR der Zielregion, sowie eine Aufreinigung dieser PCR-Produkte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die verwendeten Primer und PCR-Bedingungen sind in Tabelle 6.8 (s. 6. Anhang) aufgelistet. Das aufgereinigte Produkt diente danach als Insert für eine Klonierung in einen TOPO-TA Vektor (s. 3.2.5.1). In einer Kolonie-PCR (s.3.2.5.1.1) wurde die einklonierte Sequenz von jeweils ca. 10 Klonen erneut amplifiziert und in einer nachfolgenden Sequenzierreaktion (s. 3.2.2) die vorliegende Sequenz der einzelnen Klone bestimmt.

Die Bisulphit-Sequenzierung wurde in dieser Studie dazu verwendet eine genauere Einschätzung des Methylierungsgrades der CTCF-Bindestelle 3 der ICR1 in 11p15 zu erzielen.

3.2.4.3 Multiplex ligation-dependant Probe Amplification (MLPA)

Die MLPA ist eine Methode, deren Anwendung den gleichzeitigen Nachweis der Kopienanzahl von 45 Sequenzen ermöglicht. Es handelt sich bei der MLPA um eine Multiplex-PCR. Hierbei erfolgt eine parallele Amplifikation mehrerer Fragmente während einer PCR-Reaktion. Zur Durchführung dieser Multiplex-PCR ist die Hybridisierung spezieller Sonden an die zu amplifizierenden genomischen Regionen erforderlich. Die verwendeten Sonden liegen als Sonden-Gemisch vor und bestehen zunächst jeweils aus zwei Teilen, die räumlich nah an ihre Zielsequenz hybridisieren (s. Abb. 3.2).

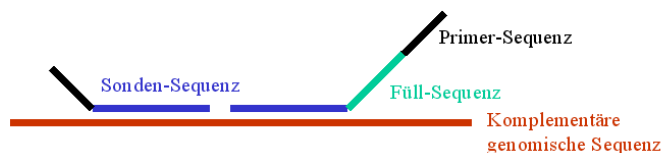


Abb. 3.2: Darstellung der Hybridisierung beider Teile einer Sonde an die Zielregion

Anschließend erfolgt eine Ligation, die eine Verbindung der beiden Sondenteile bewirkt, sofern beide Teile an die Zielsequenz anbinden konnten (s. Abb. 3.3). Mit einer nachfolgenden PCR werden nur die Sequenzen amplifiziert, bei denen es zur Hybridisierung und Ligation beider Sondenabschnitte kam.

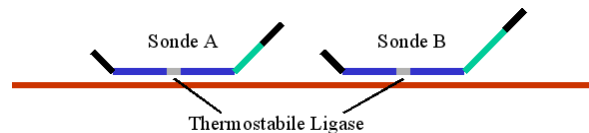


Abb. 3.3: Ligation der beiden Sonden-Abschnitte durch eine thermostabile Ligase

Die Primersequenz ist bei jeder der Sonden eines Sondenmixes die gleiche und als Linker an die spezifische Sondensequenz angehängt. Während der PCR erfolgt demnach ausschließlich eine Amplifikation der Sonde selbst und nicht der eigentlichen komplementären genomischen Sequenz. Die einzelnen PCR-Produkte der verschiedenen Sonden eines Mixes unterscheiden sich in ihrer Länge, da jede Sonde zusätzlich zur Primer-Sequenz eine so genannte Füllsequenz aufweist, die je nach Sonde eine unterschiedliche Länge besitzt. Die Größe der Produkte liegt zwischen 130 und 490 bp. Die verwendeten Primer sind fluoreszenzmarkiert, sodass mit Auftrennung der jeweiligen Fragmente nach ihrer Größe mittels Sequenzierелеktrophorese die Intensität der Fragmente mit einer automatischen Analysesoftware ermittelt bzw. quantifiziert werden kann. Anschließend erfolgt eine Verrechnung zwischen Kontroll- und Zielfragmenten, sowie zwischen Kontrollproben und Patientenproben. Hierdurch wird eine Kopienzahlermittlung der Zielregionen möglich. Liegt z.B. eine heterozygote Deletion oder Duplikation einer der beiden Allele vor, so kommt es im Vergleich zu den Kontrollfragmenten zu einer halb bzw. doppelt so starken Amplifikation.

3.2.4.3.1 Methylierungsspezifische-MLPA (MS-MLPA)

Mit Hilfe der MS-MLPA kann der Methylierungszustand einer Zielregion ermittelt werden, indem man sich die Besonderheit methylierungssensitiver Restriktionsenzyme (s. 3.2.5.4.1.1) zu Nutzen macht. Solche Enzyme können ihre Erkennungssequenz nicht schneiden sofern diese durch eine Methylgruppe geschützt wird. Bei einer MS-MLPA werden für jede Probe jeweils ein herkömmlicher methylierungsunabhängiger und ein methylierungsspezifischer Ansatz durchgeführt. Der einzige Unterschied zwischen diesen beiden Verfahren ist der Einsatz des methylierungssensitiven Enzyms während des Ligationsschrittes beim

methylierungsspezifischen Ansatz. Bei einer elterlich geprägten Region, bei der im normalen Zustand die Hälfte der Allele methyliert vorliegt, wird im methylierungssensitiven Ansatz genau dieser Anteil der Allele (also die nicht methylierten) zerschnitten. Dort wo ein Verdau der genomischen DNA stattfinden konnte, findet zwar die Hybridisierung der Sonden wie gewöhnlich statt, jedoch ist eine Ligation der beiden Sondenteile und somit eine Amplifikation nicht mehr möglich. Somit erfolgt nur noch eine halb so starke PCR-Amplifikation. Eine Hypomethylierung der Region würde somit im Vergleich zu einer normal methylierten Kontrolle zu einer noch geringeren und eine Hypermethylierung zu einer erhöhten Amplifikation führen. Die Verrechnung von Kontrollproben und Kontrollsonden macht auch hier eine Quantifizierung möglich.

Mit diesem Verfahren ist des Weiteren ein Nachweis von UPDs möglich, da es auch hier innerhalb von elterlich geprägten Regionen zu einem Unterschied im Methylierungszustand der beiden Allele im Vergleich zu Kontrollproben kommt. Duplikationen unterschiedlich methylierter Regionen machen sich aufgrund des hervorgerufenen Dosiseffekts sowohl im methylierungssensitiven als auch im parallel durchgeführten herkömmlichen Ansatz ohne Verwendung des Enzyms bemerkbar, wodurch sie von den anderen Veränderungen, wie UPDs und Methylierungsdefekten, zu unterscheiden sind.

Die MS-MLPA hat somit einen großen Nutzen in der SRS- und BWS-Diagnostik, da sowohl die bekannten Duplikationen als auch die UPDs und Methylierungsdefekte innerhalb der chromosomalen Regionen 11p15 in einem Verfahren nachweisbar sind.

Durchführung

Die MLPA wurde mit Hilfe des SALSA MS-MLPA KIT ME030 BWS/RSS der Firma MRC-Holland gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die zu untersuchenden MLPA-Proben wurden auf einem automatischen Sequenzierer (AB3130) aufgetrennt und mit Hilfe der GeneMapper v4.0-Software analysiert. Die Auswertung der Daten zur Bestimmung der Kopienzahl und des Methylierungsgrads erfolgten mit Verwendung einer modifizierten Excel-Datei, die ursprünglich zur Analyse der *BRCA2*-MLPA genutzt wurde (Clinical Molecular Genetics Laboratory, University Hospital Leeds/UK (<http://leadsdna.info/>)) (Eggermann et al., 2008c).

3.2.5 Klonierung

Bei einer Klonierung erfolgt die Vermehrung eines Zielfragmentes in Bakterienzellen nach Ligation in einen Vektor. Die verwendeten Vektoren sind künstliche Plasmide, deren Sequenz unter anderem Gene für Antibiotika-Resistenzen sowie eine so genannte „multiple cloning site“ (MCS), über die die Fragmente (Inserts) einligiert werden, beinhalten.

Die Ligation der PCR Produkte in den Vektor erfolgt entweder mit Hilfe eines Restriktionsverdaus (s. 3.2.5.4.1.1) mittels spezifischer Enzyme oder über die TA-Klonierung. Bei Verwendung eines Verdaus benötigt man Restriktionsenzyme, die den Vektor ausschließlich innerhalb der MCS-Region schneiden. Besitzt das verwendete Fragment nicht die gewünschte Schnittstelle des Enzyms, so können zur Amplifikation des Inserts Primer verwendet werden, denen die Erkennungssequenz angehängt wird. Über diese erzeugten Schnittstellen kann das Insert in den Vektor einligiert werden.

Bei der TA-Klonierung erfolgt die Ligation des Fragments in den Vektor über einen unspezifischen Anhang eines einzelnen desoxy-Adenosins am 3'-Ende des PCR-Produkts, das bedingt durch die Transferase-Aktivität der *Taq*-Polymerase bei einer herkömmlichen PCR angefügt wird. Komplementär besitzt der verwendete linearisierte TA-Vektor einen einzelnen 5'-Thymidin-Anhang. Das Fragment fügt sich somit ohne Einsatz von Restriktionsenzymen über das überstehende 3'-desoxy-Thymidin in den linearisierten Vektor ein, indem eine zugefügte DNA-Ligase die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH- und 5'-Phosphatgruppen der räumlich benachbarten Nukleotide katalysiert.

Mit Hilfe der Transformation werden die entstandenen Konstrukte anschließend in die Bakterienzelle eingebracht und dort über den „origin of replication“ einer Vermehrung im Rahmen der Zellteilung unterzogen.

3.2.5.1 TOPO TA Klonierung

Mit Hilfe der TOPO TA Klonierung (Invitrogen) ist eine schnelle Klonierung eines PCR Produktes in einen reinen Klonierungsvektor möglich. Hierbei erfolgt die Ligation des zu klonierenden Fragments in den Vektor wie bei der gewöhnlichen TA-Klonierung. Zusätzlich ist hier allerdings eine Topoisomerase I des *Vaccinia*-Virus über ein Tyrosin (Tyr-274) kovalent an das 3'-Phosphat des überhängenden Thymin des Plasmid-Vektors gebunden. Die Phospho-Tyrosin-Bindung der Topoisomerase zum Vektor wird von dem 5'-Hydroxyl des

PCR-Produktes angegriffen, sodass die Phospho-Tyrosin-Bindung gelöst wird und die Ligation stattfinden kann. Nach anschließender Transformation des Vektors in chemisch-kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) erfolgt eine Vermehrung des PCR-Produktes bei Kultivierung dieser Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein reiner Klonierungsvektor verwendet (pCR[®] II-TOPO[®] Plasmid-Vektor), der keine Expression des einklonierten Fragmentes in pro- oder eukaryotischen Zellen erlaubt. Die Klonierung dient in diesem Fall ausschließlich der Vervielfältigung eines einzelnen PCR-Fragmentes pro Bakterienklon. Dies ist möglich, da ein chemisch-kompetentes Bakterium lediglich in der Lage ist, ein einziges Plasmid bei der Transformation aufzunehmen und eine isoliert wachsende Kolonie immer die Klonen eines einzelnen Bakteriums beinhaltet.

Durchführung

In der vorliegenden Arbeit wurde die TOPO TA Klonierung im Rahmen der Bisulphitsequenzierung (s. 3.2.4.2.2), für den Associated-Chromosome-Trap-Assay (s. 3.2.12) und zur Detektion eines alternativen Spliceverhaltens bei varianter *H19*-Sequenz (s. 3.2.14) angewandt. Hierzu wurde zunächst eine PCR des benötigten Fragments durchgeführt. Das frische PCR-Produkt wurde anschließend in die Ligation eingesetzt, wobei entsprechend dem Protokoll des Herstellers eine Salz-Lösung, Aqua dest., das frische PCR-Produkt sowie der pCR[®]2.1 TA-Vektor zusammengegeben, vorsichtig gemischt und bei RT für 5-30 min inkubiert wurden.

Verwendete Reagenzien zur Ligation

Frisches PCR-Produkt	0.5-4 µl
Salz-Lösung (des TOPO TA Cloning [®] Kit)	1 µl
Aqua dest.	Restvolumen ad 5 µl
TOPO [®] Vektor	1 µl
S.O.C.-Medium (des TOPO TA Cloning [®] Kit)	350 µl

Anschließend erfolgte die Transformation des Konstruktes in One Shot[®] chemisch kompetente *E. coli*. Hierzu werden 2 µl des Ligationsansatzes in einem Reagiergefäß mit den

kompetenten Zellen vorsichtig gemischt, 5-30 min bei RT inkubiert und danach einem Hitzeschock für 30 sek bei 42°C unterzogen. Ein Abstoppen der Reaktion erfolgt bei Lagerung des Gemisches für 5 min auf Eis. Nach Zugabe von 350 µl S.O.C-Medium und horizontalem Schütteln bei 200 rpm für eine Stunde bei 37°C werden die transformierten Zellen nun kultiviert und im Anschluss auf einer vorgewärmten, mit X-Gal, IPTG und zur Selektion mit Ampicillin versetzten LB-Agar Platte (s. 3.2.5.3) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Selektion transformierter Zellen erfolgt mit Hilfe einer Ampicillin-Resistenz und einer X-Gal-Selektion. Die Zugabe von Ampicillin im Medium bewirkt, dass nur solche Zellen wachsen können, die auch ein Plasmid mit der kodierenden Sequenz für die benötigte Resistenz enthalten. Die X-Gal-Selektion beruht auf der Tatsache, dass die Substanz X-Gal in Anwesenheit des Induktors IPTG durch das Enzym β -Galaktosidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wird. Durch Einklonierung eines Konstruktes in den Vektor wird das β -Galaktosidase kodierende Gen *lacZ* unterbrochen, wodurch ein Umsetzen von X-Gal und somit eine Blaufärbung der Zellen verhindert wird. Transformierte Zellen, die tatsächlich auch das gewünschte Insert enthalten, können somit anhand ihrer weißen Färbung erkannt werden. Zur Analyse des einklonierten Fragments schließen sich eine Kolonie-PCR (s. 3.2.5.1.1) sowie eine Sequenzierung (s. 3.2.2) an.

3.2.5.1.1 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ermöglicht eine Amplifikation von DNA aus Plasmid-Vektoren von Bakterienklonen ohne vorherige Isolation des Plasmids. Nach der Kultivierung des Transformationsgemisches auf einer Agarplatte werden mit der Spitze eines sterilen Zahnstochers isoliert wachsende Kolonie leicht angestochen und die anhaftenden Zellen in 12 µl Aqua dest. gelöst. Bei einer anschließenden Denaturierung für 5 min bei 94°C werden die Bakterienzellen abgetötet und die DNA freigesetzt. Mit dieser DNA ist nun die Durchführung einer herkömmlichen PCR und somit die Amplifikation des Zielfragmentes möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kolonie-PCR zur Durchführung der Bisulphitsequenzierung (s. 3.2.4.2.2) und des ACT-Assays (s. 3.2.12) benötigt. Bei der verwendeten Taq-Polymerase handelt es sich um den Enzym-Mix der Hot Star Taq (Qiagen), die nach Herstellerangaben verwendet wurde. Angaben zu Primern und PCR-Bedingungen sind in Tabelle 6.8 und 6.12 (s. 6. Anhang) dargestellt.

3.2.5.2 Klonierung von Expressionsvektoren

Bei der Untersuchung zur Auswirkung von CTCF auf die Expression von *GRB10* und *MEST* in Plazentazellen und der Splicinganalyse von *H19*-Varianten in HEK (human embryonic kidney)-Zellen war eine Klonierung der codierenden Region der Gene in einen Vektor notwendig, der eine Expression des Inserts in eukaryotischen Zellen zulässt. Hierfür wurden die Vektoren pTargetTM (Promega) und pcDNATM5/FRT/TO (Invitrogen) gewählt. Beide Vektoren erlaubten eine Selektion transformierter Bakterien sowohl über eine Ampicillin-Resistenz als auch über die X-Gal Selektion (s. 3.2.5.1). Des Weiteren beinhaltet der Vektor die Sequenz für den humanen Cytomegalovirus (CMV)-Enhancer/Promoter, der die Expression des Inserts in eukaryotischen Zellen induziert.

Bei pTargetTM handelt es sich um einen TA-Vektor (s. 3.2.5), sodass eine Ligation des Inserts nach PCR ohne Verdau möglich ist. Für eine Ligation in pcDNATM5/FRT/TO ist ein vorgeschalteter Verdau sowohl des Inserts als auch des Vektors mit geeigneten Restriktionsenzymen notwendig. Die weiterführenden Schritte einer Klonierung wie Ligation und Transformation wurden für beide Vektoren nach demselben Protokoll durchgeführt.

Durchführung

Zur Erzeugung des Inserts wurde zunächst eine PCR mit Verwendung der AccuPrimeTM Taq DNA Polymerase High Fidelity der Firma Invitrogen gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die verwendeten Genabschnitte zur Erzeugung der Inserts, als auch Primer und PCR-Bedingungen sind in Tabelle 6.9 und 6.10 (s. 6. Anhang) aufgelistet. Der Unterschied in der Erzeugung der Inserts für *H19* und *CTCF* lag jedoch in der Verwendung des unterschiedlichen Ausgangsmaterials für die PCR.

Für die Klonierung des Gens *CTCF* wurde ein Klon der Firma RZPD Imagenes als Ausgangsmaterial benötigt (IRAU969H0450D) (s. Tab. 3.3), der bereits die komplette, codierende cDNA Sequenz des Gens beinhaltet. Da bei der späteren Transfektion des Klonierungskonstrukts von *CTCF* dessen Translation in den Zellen erzielt werden soll, wurden Primer zur Erzeugung des Inserts gewählt, welche die so genannte Kozak-Konsensus-Sequenz beinhalten. Dabei handelt es sich um eine Erkennungssequenz zur Initiierung der Translation (GCCACC). Diese Sequenz wurde dem Startcodon ATG genau vorgeschaltet, sodass der Vorwärtsprimer von 5' nach 3' zunächst die Erkennungssequenz und direkt im Anschluss daran das Startcodon und somit die *CTCF*-kodierende Region beinhaltet. Damit

erreicht man eine Translation im richtigen Leserahmen und die Synthese des funktionsfähigen Proteins.

Zur *H19*-Klonierung wurde sowohl die Wildtyp-Sequenz als auch die variante Sequenz der genomischen DNA von drei SRS-Patienten (SR17K, SR81K, SR93K) verwendet, um das Spliceverhalten dieser varianten Transkripte in eukaryotischen Zellen analysieren zu können (s. Tab. 3.5).

Bei Verwendung des pcDNATM5/FRT/TO-Vektors zur Klonierung der verschiedenen *H19*-Varianten war vor der Ligation ein Verdau sowohl des Vektors als auch des Inserts notwendig. Den Primern zur Erzeugung des Inserts von *H19* waren aus diesem Grund die Schnittstellen für die benötigten Restriktionsenzyme angefügt worden, sodass alle amplifizierten PCR-Produkte diese Erkennungssequenzen aufwiesen. Hierbei erhielt der Vorwärts-Primer an seinem 5'-Terminus die Erkennungssequenz für das Enzym BamHI und der Rückwärtsprimer für NotI. Der Vektor wies diese Schnittstellen innerhalb seiner MCS-Region in der benötigten Orientierung selbständig auf. Da bei der Klonierung des Inserts darauf geachtet werden muss, dass der 5'-Terminus des Inserts in der richtigen Anordnung zum CMV-Promoter einligiert wird, ist die Verwendung unterschiedlicher Restriktionsenzyme für die beiden Enden eines Inserts von großem Nutzen, um eine falsche Orientierung des Inserts innerhalb des Vektors zu vermeiden.

Tab. 3.5: Verwendete Vektoren, Inserts und Enzyme zur Herstellung der benötigten Konstrukte

Vektor	Insert	Enzym
pcDNA TM 5/FRT/TO	H19-FBamHI/RNotI *	BamHI; NotI
pTarget TM	CTCF-5'UTR-F/3'UTR-R	TA-Klonierung

* Jeweils für das Wildtyp-Allel und das variante Allel der Patienten SR17K, SR81K und SR93K

Vor der Ligation erfolgte eine Aufreinigung der verschiedenen Inserts mit dem PCR-Purification-Kit bzw. dem QIAquick-Gelextraction-Kit der Firma Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers. Sowohl bei der TA-Ligation des pTarget-Vektors als auch bei der Ligation über Restriktionsschnittstellen in den pcDNATM5/FRT/TO-Vektor wurde eine T4-Ligase aus dem Bakteriophagen T4 der Firma Promega verwendet.

10 µl Ligationsansatz

T4 DNA Ligase Puffer 10x	1 µl
Vektor	60 ng
Insert	x ng
T4 Ligase	1 µl
Aqua dest.	Restvolumen ad 10 µl

Die Menge des einzusetzenden Inserts richtet sich nach seiner Größe. Bei allen durchgeführten Ansätzen wurde ein Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 gewählt (s. Tab. 3.6). Die genaue Menge lässt sich hierzu mit folgender Gleichung berechnen:

$$\text{Menge Insert [ng]} = (\text{Menge Vektor [ng]} \times \text{Länge Insert [bp]} : \text{Länge Vektor [bp]}) \times (3 : 1)$$

Tab. 3.6: Menge an verwendetem Insert zur Ligation

Insert	Größe Insert (bp)	Vektor	Größe Vektor (bp)	Eingesetzte Menge Insert (ng)
CTCF-5'UTR-3'UTR	2196	pTarget TM	5670	70
H19-FBamHI-RNotI	2827	pcDNA TM 5/FRT/TO	5137	99

Die Ligation erfolgte bei 4°C über Nacht.

3.2.5.3 Transformation

Mit Hilfe der Transformation erfolgt die Aufnahme von Plasmiden in eine Bakterienzelle. In der vorliegenden Arbeit wurden die chemisch kompetenten JM109-*E. coli* der Firma Promega verwendet. Die Zellen werden zur Transformation nach Zugabe des Konstrukts auf Eis inkubiert, um dessen Anlagerung an die Zellmembran zu bewirken. Anschließend wird ein kurzer Hitzeschock durchgeführt, bei dem sich die Poren der Membran öffnen und das Konstrukt in das Innere der Zellen gelangen kann. Bei einer darauf folgenden Kultivierung der Zellen bei 37°C für eine Stunde im Schüttler mit SOC-Medium kann sich die Zellmembran regenerieren.

Zur Kultivierung der Zellen werden die Zellen anschließend auf einem antibiotika- und nährstoffhaltigem LB-Agar ausgestrichen. Die Bakterien besitzen keine kodierende Sequenz

für eine Antibiotika-Resistenz und sind somit nur nach Aufnahme eines Plasmids mit den benötigten Genen für diese Resistenz in der Lage auf dem verwendeten antibiotikahaltigen Medium zu wachsen. Zur weiteren Selektion transformierter Bakterien diente die X-Gal-Selektion (s. 3.2.5.1).

Reagenzien

LB-Medium (Luria Broth) (autoklaviert)	1% Bacto-Trypton 0,5% Bacto-Yeast Extract 0,5% NaCl pH 7,5 mit NaOH Ampicillin 50 µg/µl
LB- Agar (autoklaviert)	1,5% Bacto-Agar in LB-Medium ca. 30 ml/ Platte
SOC-Medium	0,5% Bacto-Yeast Extract 2% Bacto-Trypton 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose
IPTG	100 mM
X-Gal	40 µg/ ml in Dimethylformamid

Durchführung

25 µl der JM109-*E. coli*s (Promega) wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 µl des Ligationsansatzes versetzt und für 10 Minuten auf Eis gehalten. Dann folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 sek im Wasserbad und eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Anschließend wurden dem Ansatz 250µl SOC-Medium hinzugefügt und dieser horizontal für eine Stunde bei 37°C bei 150 rpm geschüttelt. Nun erfolgte das Ausplattieren auf ampicillin-haltigen LB-Agarplatten indem 100 µl der Zellsuspension auf einer Platte mit Hilfe eines sterilen Drigalski-Glasspatels ausgestrichen wurden. Eine Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C im Brutschrank über Nacht.

Wenn möglich wurde nach dieser Kultivierung eine Übernachtskultur (ÜN-Kultur) von 24 positiven Klonen angelegt. Hierzu wurden die entsprechenden Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze leicht berührt und diese in ein mit etwa 10 ml LB-Flüssigmedium gefülltes Gärröhrchen überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Schüttler bei 37°C und 200 rpm. Anschließend erfolgt eine Plasmidisolation (s. 3.2.5.4) der kultivierten Bakterienklone.

3.2.5.4 Plasmidisolation

Die Isolation der klonierten Plasmide aus *E. coli*-Zellen erfolgte mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Verfahren. Dabei handelt es sich um die so genannte Boiling-Preparation und um die Minipräparation mittels des QIAprep® Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen. Während die Boiling-Präparation eine kostengünstige Alternative zum Screening nach positiven Klonen darstellt, dient die Minipräparation einer qualitativ besseren Isolation, die eine anschließende Sequenzierung und Transfektion des Plasmids (s. 3.2.7) erlaubt.

3.2.5.4.1 Boiling-Präparation

Diese Art der Plasmidisolation beruht auf dem Prinzip, dass mit Hilfe einer Denaturierung aller zelleigenen Proteine bei 95°C diese durch Zentrifugation von der Plasmid-DNA separiert werden können. Die Proteine sammeln sich als Pellet und können von der im Überstand gelöst vorliegenden DNA getrennt werden.

Reagenzien

STET-Puffer, pH 8	8 g Sukrose
	0,5 g Triton-X-100
	1,9 g EDTA
	0,6 g Tris
	ad 100 ml Aqua dest.
Lysozym	42.350 U/μl

Durchführung

1,5 ml der nach der Transformation angesetzten ÜN-Kultur wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und 15 min bei 4°C und 8000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 350 µl STET-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 25 µl Lysozym-Lösung (10mg/ml) 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Ansatz zur Denaturierung der Proteine für 40 sek auf 95°C erhitzt. Bei der anschließenden Zentrifugation für 10 min bei RT und 13.000 rpm sammelte sich das Pellet aus Zellproteinen, das nun mit einem sterilen Zahnstocher aus dem Reaktionsgefäß entfernt wurde. Die im Überstand verbliebene DNA wurde daraufhin mit 420 µl Isopropanol sowie 40 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,8) bei Zentrifugation für 10 min und 4°C ausgefällt. Das DNA-Pellet wurde zum Waschen mit 500 µl 70%-igem Ethanol versetzt und für 10 min bei 4°C mit 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte ein Trocknen des DNA-Pellets im Wärmeschrank für 30 min bei 50°C.

Zur Absicherung, dass es sich bei dem isolierten Plasmid tatsächlich um das gewünschte Konstrukt handelt, erfolgte im Anschluss an die Isolation mittels Boiling-Präparation ein selektiver Restriktionsverdau (s. 3.2.5.4.1.1).

3.2.5.4.1.1 Restriktionsverdau

Bei einem Restriktionsverdau zerschneiden Restriktionsenzyme (Restriktionsendonukleasen des Typ II) einen DNA-Doppelstrang innerhalb einer spezifischen Nukleotidsequenz. Diese Restriktionsschnittstellen enthalten charakteristischerweise eine palindrome Sequenz von vier bis acht Basenpaaren.

Der Restriktionsverdau wurde in der vorliegenden Arbeit neben der Herstellung von Schnittstellen zur Ligation bei der Klonierung (s. 3.2.5.2) und dem ACT-Assay (s. 3.2.12) dazu verwendet, Klonierungsprodukte nach Isolation aus Bakterienzellen zu zerschneiden. Bei geeigneter Wahl der Restriktionsenzyme kann man so ein charakteristisches Fragmentmuster erhalten und somit bewerten, ob das isolierte Plasmid eines speziellen Klons tatsächlich das gewünschte Insert enthält und ob es in der richtigen Orientierung einligiert wurde.

Durchführung15µl Ansatz

PCR-Produkt	10 µl
Restriktionsenzym	6 U
10x zugehöriger Enzympuffer	1,5 µl
Aqua dest.	Restvolumen ad 15 µl

Beim Restriktionsverdau werden 10 µl des PCR-Produkts mit 6 U des entsprechenden Restriktionsenzyms und 1,5 µl des dazugehörigen 10x Puffers versetzt. Sowohl die Inkubationsdauer des Ansatzes als auch die Temperatur sind abhängig vom verwendeten Enzym.

Für den Restriktionsansatz nach der Boiling-Präparation wurde ein 30 µl Ansatz verwendet, der direkt zum getrockneten Pellet des isolierten Plasmids gegeben wurde. Nach dem Verdau wurde die Hälfte des Ansatzes auf einem 1%-igem Agarose-Gel bei 120 V für 30 min aufgetrennt und die entstandenen Restriktionsbanden nach ihrer Größe analysiert (s. Tab. 3.7).

Tab. 3.7: Verdauemuster der unterschiedlichen Klonierungsprodukte

Enzym	Klonierungsprodukt	Verdauprodukt bei korrekter Orientierung des Inserts (bp)	Verdauprodukte bei falscher Orientierung des Inserts (bp) / Leervektor (bp)
PstI	pTarget TM -CTCF-5'UTR-3'UTR	3652, 2187, 2023	3652, 3145, 1065 / 3652, 2019
XhoI	pcDNA TM 5/FRT/TO-H19-FBamHI-RNotI	5404, 1820, 681, 26	- / 5137

3.2.5.4.2 Minipräparation

Für eine qualitativ hochwertige Plasmidisolierung, die eine anschließende Sequenzierung des Inserts sowie eine Transfektion (s. 3.2.7) des Konstruktes erlaubt wurde eine Minipräparation mittels des QIAprep® Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die verwendeten Kulturen wurden zum groben Screening positiver Klone bei einem vorangegangenen Test-Verdau nach der Boiling-Präparation vorselektiert. Zur Plasmidisolierung mittels Minipräparation wurden 4,5 ml der ÜN-Kultur eines Klons verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Um sicherzustellen, dass der Vektor das vollständige

und fehlerfreie Insert enthielt, wurde eine Sequenzierung der isolierten Plasmid-DNA mit innerhalb der Vektorsequenz lokalisierten Primern T7 und SP6, sowie mit Insert-spezifischen Primern durchgeführt.

3.2.6 Zellkultur

Zur Untersuchung diverser Fragestellungen, wie zum Beispiel der Expressionsregulation von Genen oder dem alternativen Splicing von RNA im eukaryotischen Zellsystem, müssen Zellkulturen der relevanten Gewebe angelegt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit waren vor allem humane Zellsysteme, wie plazentares Gewebe, für die benötigten Analysen von Interesse. Man unterscheidet hierbei zwischen der Verwendung primärer Zellkulturen, die aus frischem Gewebe angelegt sind und eine begrenzte Lebensdauer aufweisen, und permanenten immortalisierten Kulturen, die die Möglichkeit einer unbegrenzten Zellteilung aufweisen.

3.2.6.1 EBV-Kulturen

Bei einer EBV-Zelllinie handelt es sich um eine permanente, lymphoblastoide B-Lymphocyten-Zelllinie, die eine unbegrenzte Lebensdauer bedingt durch eine Transformation mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) aufweist. Der Epstein-Barr-Virus (Neitzel et al., 1986) ist ein humanpathogenes Herpesvirus, das mit dem Burkitt-Lymphom in Afrika und dem nasopharyngealen Carcinom in Südost-Asien assoziiert ist. Bei der Herstellung einer EBV-Kultur wird der zu infizierenden Blutprobe das Virus hinzugefügt, welches selektiv B-Lymphocyten transformiert und diese somit immortalisiert und unter Zellkulturbedingungen dauerhaft passagierbar macht. Somit erhält man einen unbegrenzten Vorrat einer bestimmten Zellkultur für weiterführende Untersuchungen.

Reagenzien

Frischblutlysispuffer (FBLP) (1 l)

Ammoniumchlorid (NH ₄ CL)	155 mM	8,3 g
Kaliumcarbonat (KHCO ₃)	10 mM	1,0 g
EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ *2H ₂ O) (pH7,0)	0,1 mM	37 mg

Aqua dest. Restvolumen ad 1 l

Sterilfiltration durch 0,2 µm Filter; Lagerung bei 4°C

RPMI-Medium

RPMI 1640		500 ml
Penicillin/Streptomycin	(10.000 µg/ml)	5 ml
Fungizone/Amphotericin B	(1,25 mg/ml)	280 µl
FKS		120 ml
L-Glutamin		5 ml

Neuansatz

Blut	ca. 5 ml
Frischblutlyseisopuffer (FBLP)	ad 50 ml
EBV-Überstand	2 ml
RPMI-Medium	3 ml
Cyclosporin A	8 µl

Durchführung

Zum Ansetzen einer EBV-Kultur wurden ca. 5 ml Blut mit dem FBLP auf 50 ml aufgefüllt und zur Zelllyse 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden durch Zentrifugation bei 1.500 rpm für 10 min die kernhaltigen Lymphocyten als Zellpellet angereichert und die kernlosen Erythrocyten mit dem Überstand verworfen. Nach dem Lösen des Pellets in 50 ml FBLP wurden sowohl die Lyse als auch der Zentrifugationsschritt wiederholt. Die nun weitestgehend isoliert vorliegenden Lymphocyten wurden anschließend in 2 ml des mit einem 0,45 µm Filter zweimal steril filtrierten EBV-Überstandes gelöst und 1-1,5 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach diesem Transformationsschritt wurden die Zellen mit 3 ml RPMI-Medium und 8 µl Cyclosporin A versetzt und in eine 50 ml Kulturflasche überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5%iger CO₂-Zufuhr.

Die transformierten Zellen wachsen nicht adhären, sondern als freie Zellaggregate im Medium. Es erfolgt alle zwei bis drei Tage ein Zufüttern von 2 ml RPMI-Medium, bis nach ca. 1,5 Wochen die ersten proliferativen Zellaggregate mikroskopisch sichtbar werden. Bei verstärktem Wachstum der Zellen und einem größeren Kulturvolumen werden den Zellen in den gleichen Zeitabständen 4 ml Medium zugefügt. Die Zellaggregate erreichen nach

ca. 3 Wochen Kultivierung eine makroskopisch sichtbare Größe, sodass bei einem Kulturvolumen von ca. 30 ml eine Weiterverarbeitung der Zellen, wie z.B. DNA- oder RNA-Isolation (s. 3.2.8), durchgeführt werden kann. Durch ein Splitten der Kultur und eine Aufteilung auf zwei neue Kulturgefäße kann die Vermehrung der Zellen fortgeführt werden.

3.2.6.2 HEK293- und Cos7-Zellkulturen

Zur Analyse von alternativen Splicevarianten bei diversen *H19*-Genkonstrukten wurden HEK293 (Human Embryonic Kidney) und Cos7 Zelllinien verwendet, die beide vom Institut für Biochemie des Universitätsklinikums Aachen zur Verfügung gestellt wurden. Die Cos7-Zelllinie ist eine Affen-Nieren-Zelllinie (Epithelzellen aus der Niere der grünen Meerkatze), während es sich bei HEK293-Zellen um embryonale Nierenepithelzellen des Menschen handelt. Beide Zelllinien sind immortalisiert und wachsen adhärent und kontakthinhibiert.

Durchführung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 10 ml antibiotikafreiem *Dulbecco's Modified Eagle* Medium, versetzt mit fetalem Kälberserum (FKS) (10%), bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% in Kulturschalen. Erzielten die Zellen eine Kulturdichte von ca. 90% so wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 2 ml 1xPBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA für etwa 5 min bei 37°C inkubiert, um die Zellen vom Boden der Kulturschale abzulösen. Danach wurden die Zellen in Medium gelöst und auf eine größere Anzahl von Platten erneut ausgesät. Somit erzielte man eine Vervielfältigung der Zellen auf mehrere Kulturschalen zur anschließenden Weiterverarbeitung.

3.2.6.3 Primäre Plazentazellkultur

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Transfektion von Plazentazellkulturen zur Analyse der Relevanz des Proteins CTCF auf die Expression verschiedener Gene. Hierbei war vor allem die Untersuchung embryonaler bzw. plazentarer Zellsysteme von großem Interesse, sodass die Kultivierung eines primären, plazentaren Trophoblastengewebes durchgeführt wurde.

Durchführung

Das benötigte plazentare Gewebe wurde kurz nach termingerechter Entbindung unauffälliger Schwangerschaften zur Kultivierung angesetzt. Hierzu wurde ein kleines Stück des embryonalen Gewebes herauspräpariert und in Stecknadelkopf große Stücke zerteilt. Diese wurden vereinzelt auf eine 10 cm Kulturschale aufgesetzt und zur Anhaftung für 10 min bei RT inkubiert. Pro Schale wurden ca. sechs Gewebestücke verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml des Amniomax II Mediums, versehen mit 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Amphotericin, bedeckt und bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt im Brutschrank kultiviert. Nach ca. einer Woche erfolgen die ersten Teilungen von Zellen aus den Gewebestücken. Ein Mediumswechsel erfolgte alle drei bis vier Tage bis eine Zelldichte von ca. 80-90% erreicht wurde. Das Splitten der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 3.2.6.4 beschrieben. Bei Verwendung von primären Zellkulturen zur Transfektion muss auf eine niedrige Anzahl von vorhergegangenen Passagen geachtet werden, um eventuelle Auswirkungen von Veränderungen innerhalb des Expressionsmusters, aufgrund von langzeitigen Kultivierungsvorgängen, zu vermeiden.

3.2.7 Transfektion

Unter Transfektion versteht man die Einführung von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen. Hierzu wurde das Transfektions-Reagenz LipofectamineTM 2000 der Firma Invitrogen verwendet. Durch Zusammenbringen der Transfektionslösung mit der zu transfizierenden DNA lagern sich kationische Lipide um die anionische DNA. Wird dieser Lipid-DNA-Komplex nun zu den Zellen gegeben, binden die lipophilen Komplexe an die hydrophoben anionischen Membranen der Zellen woraufhin diese miteinander fusionieren und die DNA in die Zellen aufgenommen wird. Bei Verwendung eines eukaryotischen Expressionsvektors erfolgt hier eine Überexpression des inklonierten Fragments.

Durchführung

Die Transfektion der Zellen erfolgte bei einer Zelldichte von ca. 80-90%. Zunächst wurden in zwei getrennten Ansätzen 12 µg DNA und 24 µl LipofectamineTM 2000 mit je 600 µl des Kultivierungsmediums OptiMEM[®] I (Gibco) versetzt und 5 min bei RT gelöst. Anschließend erfolgte ein Mischen der beiden Ansätze und eine erneute Inkubation bei RT für 30 min. Das

Reaktionsgemisch wurde daraufhin zu den Zellen gegeben und bei 37°C im Brutschrank für 24 Stunden inkubiert. Die durchgeführten Transfektionen sind in Tabelle 3.8 aufgelistet.

Tab. 3.8: Verwendete Konstrukte und Zellsysteme der durchgeführten Transfektionen

Verwendetes Zellsystem	Verwendetes Konstrukt
Primäre Plazentazellkultur (s. 3.2.6.3)	pTargeT TM -CTCF-5'UTR-3'UTR
HEK293 (s. 3.2.6.2)	pcDNA TM 5/FRT/TO-H19-FBamHI-RNotI *
Cos7 (s. 3.2.6.2)	pcDNA TM 5/FRT/TO-H19-FBamHI-RNotI *

* Jeweils für das Wildtyp-Allel und das variante Allel der Patienten SR17K, SR81K und SR93K

3.2.8 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA erfolgte in der vorliegenden Arbeit sowohl aus transfizierten HEK293, Cos7 und primären Plazentazellen als auch aus EBV-Zellkulturen und Blut.

Bei Isolation der RNA aus adhärent wachsenden Zellen wurde zunächst das Medium entfernt, die Zellen anschließend mit 2 ml 1xPBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA für etwa 5 min bei 37°C inkubiert, um die Zellen vom Boden der Kulturschale abzulösen. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 4 ml des verwendeten Kultivierungsmediums hinzugefügt. Sowohl die abgelösten adhärent wachsenden Zellen als auch die EBV-transfizierten Kulturen wurden anschließend in 50 ml Falcon-Tubes überführt und bei 3.000 rpm für 10 min zentrifugiert, um die Zellen am Boden des Röhrchens zu sammeln. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte nun die RNA-Isolation mittels des QIAamp RNA Blood Mini Kits von QIAGEN gemäß den Angaben des Herstellers. Die RNA wurde in 30 µl Aqua dest. eluiert und bei 65°C für 10 min denaturiert um eine Ausbildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde photometrisch bestimmt.

3.2.9 RT-PCR („Reverse Transcription“-PCR)

In der Reversen Transkription (RT) werden RNA-Moleküle, meistens mRNA, mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase, in einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierzu werden Reverse Transkriptasen aus Retroviren verwendet wie zum Beispiel die des Affen-Myeloblastosevirus (AMV). Zur Durchführung der RT werden des Weiteren Primer zur Amplifikation benötigt. Die größte

Anwendung finden hierbei so genannte „random Primers“, die eine zufällige Sequenz besitzen oder Oligo(dT)-Primer, die an den PolyA-Schwanz der mRNAs binden. Es erfolgt somit eine unspezifische cDNA-Synthese. Zunächst findet eine so genannte Erststrangsynthese statt bei der ein Hybrid-Doppelstrang aus RNA und DNA gebildet wird. Durch den Abbau der RNA in einen DNA-Einzelstrang und die anschließende Zweitstrangsynthese wird dieser jedoch in einen DNA-Doppelstrang umgewandelt. Die produzierte cDNA ist in ihrer Struktur weitaus stabiler als ihre komplementäre RNA und erlaubt eine einfachere Handhabung in nachfolgenden Analysen.

In der vorliegenden Arbeit fand ausschließlich die Verwendung von Oligo(dT)-Primern statt.

Durchführung

Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des Reverse Transcription Systems der Firma Promega gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. In einen 20 µl-Ansatz wurde 1 µg der isolierten RNA eingesetzt und mittels Oligo(dT)-Primern in cDNA umgeschrieben.

20 µl Ansatz

MgCl ₂	(25 mM)	4 µl
Reverse Transcription Buffer	(10x)	2 µl
dNTP Mix	(10 mM)	2 µl
Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor		0,5 µl
AMV Reverse Transcriptase		1 µl
Oligo(dT)-Primer		1 µl
RNA		1 µg
Nuklease-freies Wasser	Restvolumen ad 20 µl	

Die cDNA-Synthese lief unter folgenden Bedingungen ab:

1. 30 min 45°C
2. 5 min 95°C
3. 4°C zur Lagerung

Im Anschluss an die RT-PCR wurde der Ansatz mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt und die cDNA in 50 µl Aqua dest. eluiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die cDNA unter anderem zur Durchführung quantitativer Expressionsanalysen mit Hilfe der Real-Time PCR (s. 3.2.10.2) oder für die Fragmentanalyse (s. 3.2.3.1) zur Detektion von Splicevarianten des Gens *H19* verwendet.

3.2.10 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR dient der Kopienzahlbestimmung genomischer DNA Abschnitte (s. 3.2.10.1) oder auch der quantitativen Analyse der Expression verschiedener Gene auf cDNA Ebene (s. 3.2.10.2). Während der Durchführung einer PCR wird hier die Menge des entstehenden Produktes über die Zeit der Amplifikation hinweg dauerhaft nach jedem Zyklus bestimmt. Zur Detektion und Messung der Konzentration der PCR-Produkte gibt es die Möglichkeit der Verwendung von spezifischen Sonden oder die der Nutzung von SYBR-Green.

Sonden sind Oligonukleotide, die komplementär zu der nachzuweisenden Zielsequenz sind und nur an die spezifischen Sequenzen einzelsträngiger Matrizen binden. Es handelt sich hierbei demnach um einen sehr spezifischen allerdings auch kostspieligen Nachweis.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher ausschließlich der Farbstoff SYBR-Green zur Detektion verwendet. SYBR-Green interkaliert unspezifisch zwischen die Basenpaare der DNA und erzeugt dadurch ein Fluoreszenzsignal. Bei ansteigender PCR-Produkt-Konzentration nimmt somit auch die Stärke des nachweisbaren Fluoreszenzsignals zu. Der Nachteil dieser Methode ist die gleichzeitige Detektion unspezifischer Produkte, jedoch liegt ihr Vorteil in der einfachen und relativ preiswerten Anwendung.

Durch Einsatz einer Standardreihe mit bekannter DNA- bzw. cDNA-Konzentration und normaler DNA-Kopienzahl bzw. normalem Transkriptverhältnis exprimierter Gene wird eine absolute Quantifizierung der Ziel-Fragmente möglich.

Nach Ablauf der PCR wird in der nachfolgenden Analyse der Zeitpunkt bestimmt, an dem eine bestimmte Fluoreszenz-Intensität (Threshold) erreicht wurde. Diese wird anschließend gegen die DNA-Konzentration aufgetragen. Auf der Basis der DNA-Standardreihe erhält man eine Standardkurve, an der jede Zeit, die von einer Probe zum Erreichen des oben genannten Threshold benötigt wird, einer DNA-Konzentration zugeordnet werden kann. Somit können Rückschlüsse auf die eingesetzte Ausgangsmenge der DNA-Proben und ihre Konzentration gemacht werden.

3.2.10.1 Quantitative Real-Time PCR zur Expressionsanalyse

In der vorliegenden Arbeit wurde die quantitative Real-Time PCR zur Quantifizierung von cDNA verwendet.

Nach Isolation von gesamt RNA (s. 3.2.8) aus einem Ziel-Gewebe und Umschreiben dieser RNA in cDNA (s. 3.2.9) kann die quantitative PCR mit cDNA-spezifischen Primern durchgeführt werden. Um eine Amplifikation von genomischer DNA zu verhindern, die möglicherweise bei der RNA-Isolation mit isoliert wurde, werden Primer verwendet, die intronüberspannend lokalisiert sind. Das bedeutet, dass der erste Teil einer der beiden Primer im 3'-Bereich des einen Exons und der zweite Teil desselben Primers im 5'-Bereich des nächsten Exons liegt. Somit ist ausschließlich eine Amplifikation von cDNA möglich.

Für die Durchführung der quantitativen Real-Time PCR benötigt man neben der cDNA aus dem Zielgewebe ebenfalls eine Standardreihe sowie Primer für das Ziel-Gen und für ein Referenzgen, für das eine normale Expression in den zu vergleichenden Proben erwartet wird und das somit zur Normierung der Werte verwendet werden kann. In jedem Lauf wird für jede zu untersuchende Probe sowohl ein Ansatz für das Ziel- als auch für das Referenzgen verwendet. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 6.11 (s. 6. Anhang) dargestellt.

Durchführung

In der vorliegenden Arbeit wurde die quantitative RT-PCR auf cDNA-Ebene zur Expressionsanalyse der Gene *GRB10*, *PEG1/MEST* und *MYC* (Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog, OMIM *190080) nach Transfektion einer plazentaren Trophoblastenzellkultur (s. 3.2.6.3) mit dem Konstrukt aus dem pTargetTM-Vektor und der codierenden Region des Gens *CTCF* durchgeführt (s. 3.2.5.2). Der Einfluss von CTCF auf die benannten Gene sollte daran gemessen werden in wie weit sich ihr Expressionsverhalten durch die Überexpression von *CTCF* verändert. Bei diesem Versuch wurde in jedem Lauf die cDNA von jeweils drei transfizierten und drei untransfizierten Zellkulturen verwendet, wobei alle sechs miteinander verglichenen Kulturen immer von einer gleichen Ausgangskultur stammten.

Des Weiteren wurde bei einem SRS-Patienten mit maternaler Duplikation der ICR1 in 11p15 eine Expressionsanalyse des *KCNQ1* Gens in Blut durchgeführt.

Die Durchführung der RNA-Isolation (s. 3.2.8) sowie der RT-PCR (s. 3.2.9) erfolgte wie bereits beschrieben.

Zur Durchführung der quantitativen Real-Time PCR wurde das QuantiTect SYBR[®] Green Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Für die Amplifikation der analysierten Gene wurden, bis auf die Primer für das Gen *CTCF*, die QuantiTect[®] Primer Assays desselben Herstellers verwendet. Hierbei handelt es sich um speziell etablierte Primer, die eine spezifische Amplifikation der Gene für diese spezielle Anwendung garantieren. Für das Gen *CTCF* mussten selbstständig ausgewählte Primer verwendet werden, da die kommerziell bei Qiagen erhältlichen Primer für dieses Gen außerhalb der kodierenden Region lokalisiert waren und das verwendete Konstrukt zur Transfektion ausschließlich diese kodierende Region beinhaltete. Alle Angaben zu den verwendeten Primern sind in der Tabelle 6.11 (s. 6. Anhang) aufgeführt.

Für die Durchführung der PCR wurden des Weiteren Primer für das Haushaltsgen TATA box binding protein (*TBP*) verwendet. Bei Haushaltsgenen handelt es sich um Gene, die den Grundstoffwechsel der Zelle regulieren und unabhängig vom Zelltyp und äußeren Faktoren exprimiert werden. Das *TBP* diente in dieser Studie demnach als Kontrollgen zur Normierung der Expression des Zielgens bei Kontrollpersonen bzw. untransfizierten Wildtyp-Zellen. Seine Expression wird nicht durch die Transfektion mit *CTCF* beeinflusst und kann somit als Abgleich zwischen den Werten transfizierter und nicht transfizierter Zellen dienen. *MYC* diente im Fall der Transfektionsversuche als Positivkontrolle, da *CTCF* bekanntermaßen eine transkriptionelle Repression auf *MYC* auswirkt (Filipopova et al., 1996).

Angaben zu den verwendeten Standardreihen und cDNA-Kontroll- bzw. Zielproben sind in den Tabellen 3.9 und 3.10 angegeben.

Bei jeder Durchführung wurden sowohl die Primer aller verwendeten Gene als auch die jeweilige Standardreihe gleichzeitig angesetzt.

Tab. 3.9: Verwendete cDNA-Proben zur Expressionsanalyse für *KCNQ1*

Gene	Verwendete Standardreihe	Verwendete Patienten/Kontroll cDNA
<i>KCNQ1</i>	Plazentare Wildtyp-cDNA (Verdünnungsreihe: konzentriert; 1:10; 1:100)	cDNA aus EBV-transformierten Lymphozytenzelllinien
<i>TBP</i>	cDNA aus der EBV-transformierten Lymphozytenzelllinien E11-05 (Verdünnungsreihe: 1:10; 1:100; 1:1000)	cDNA aus EBV-transformierten Lymphozytenzelllinien (1:100 verdünnt)

Tab. 3.10: Verwendete cDNA-Proben zur Expressionsanalyse von *GRB10* und *MEST*

Gene	Standardreihe	Kontrollproben	Zielproben
Zielgene: <i>CTCF</i> , <i>GRB10</i> , <i>PEG1/MEST</i> Kontrollgen: <i>MYC</i> Referenzgen: <i>TBP</i>	Plazentare Wildtyp-cDNA (Verdünnungsreihe: konzentriert; 1:10; 1:100)	cDNA von drei untransfizierten Zellkulturschalen einer Plazenta	cDNA von drei mit dem pTarget TM -CTCF-5'UTR-3'UTR Konstrukt transfizierten Trophoblastenkulturschalen

50µl Ansatz pro cDNA und Gen

2x QuantiTect SYBR Green PCR	25 µl
Master Mix	
10x QuantiTect Primer Assay	5 µl
(bzw. CTCF-TM-4-5F/5R Primer)	jeweils 15 pmol)
RNase-freies Wasser	Restvolumen ad 45 µl
cDNA	≤ 5µl (≤ 100 ng)

Der oben aufgeführte Ansatz wurde, für alle cDNAs mit dem gleichen Primer, in einem Mix angesetzt. 45 µl des Mixes wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, mit 5 µl cDNA sorgfältig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden zwei mal 22 µl in PCR-Tubes pipettiert. Man erhält somit für jede cDNA einen Doppelansatz.

Die PCR wurde in dem Applied Biosystems PRISM 7000 durchgeführt und mit der entsprechenden Software analysiert.

Das verwendete Programm entsprach folgenden Angaben:

1.	2 min	50°C	
2.	15 min	95°C	
3.	15 sec	94°C	} 40x
4.	30 sec	55°C	
5.	30 sec	72°C	

Bei Auswertung der Ergebnisse im Fall der Transkriptionsversuche wurde in jedem Lauf für jedes analysierte Gen jeweils der Mittelwert der Messungen bei den drei *CTCF*-transfizierten und den drei untransfizierten Platten gebildet. Die Mittelwerte der untransfizierten Zellen wurden für jedes Gen jeweils gleich 1 gesetzt und hierzu der Mittelwert der transfizierten

Platten verrechnet, um eine Normierung zwischen der Genexpression untransfizierter und transfizierter Zellen zu ermöglichen. Da durch *CTCF* kein Einfluss auf die *TBP*-Expression zu erwarten ist, konnten die normierten Werte der *TBP*-Expression mit der normierten Expression der Zielgene verglichen werden und somit mögliche Einflüsse durch äußere Faktoren, wie zum Beispiel eine größere Menge Zellen auf einer der Platten, herausgerechnet werden. Man erhält relative Angabe zur Expressionsänderung der verschiedenen Gene im Vergleich zwischen *CTCF*-transfizierten und untransfizierten Zellen. Insgesamt wurde als Ausgangskultur die Trophoblastenzellkulturen von drei separaten Plazenten verwendet, wobei jeweils eine Analyse von drei Kulturschalen mit und ohne Transfektion durchgeführt wurde. Die quantitativen Analysen wurden für jede Transfektion mindestens zweimal wiederholt.

Für die Expressionsversuche von *KCNQ1* wurden die normierten Werte der Kontroll-cDNAs mit den Werten der Patienten-cDNAs verglichen.

3.2.11 Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH)

Mit Hilfe der FISH kann eine bestimmte genomische Sequenz auf fixierten Chromosomenpräparaten mit fluoreszenzmarkierten Nukleinsäuresonden nachgewiesen werden. Diese Methode wird unter anderem zur Bestimmung der Kopienanzahl einer chromosomalen Region oder deren Lokalisation innerhalb eines Chromosomensatzes verwendet. Die dazu benötigten Sonden binden über komplementäre Basenpaarung an ihre Zielsequenzen. Im vorliegenden Fall handelt es sich um „single-copy Sonden“, deren komplementäre Sequenz nur einmal im haploiden Genom vorhanden ist und somit eine spezifische Detektion der Zielregion ermöglicht.

Zur Fluoreszenzmarkierung der Sonden unterscheidet man a) die direkte Markierung bei der die Sonden direkt mit Fluorochromen markiert sind, sodass keine weitere Detektion erforderlich ist, und b) die indirekte Markierung. Des Weiteren ist eine Verwendung mehrerer spezifischer Sonden zur Detektion unterschiedlicher Zielregionen während einer FISH möglich. In der vorliegenden Studie wurde eine FISH mit Verwendung zweier unterschiedlich direkt markierter Sonden durchgeführt.

Standardmäßig findet bei der FISH eine Vorbehandlung der Präparate statt, bei der z.B. proteolytische Enzyme und RNasen eingesetzt werden um Proteine und RNAs zu entfernen. Vor der Hybridisierung der Sonden auf den Präparaten erfolgt eine Denaturierung sowohl der

Sonden als auch der fixierten DNA auf dem Objektträger, um eine Anlagerung komplementärer Sequenzen zu ermöglichen.

Eine FISH kann je nach Fragestellung sowohl mit Metaphase als auch Interphasekernen durchgeführt werden.

3.2.11.1 Zwei-Farben FISH mit direkter Markierung der Sonden

Mit Hilfe der Zwei-Farben-FISH ist es möglich, zwei unterschiedliche chromosomale Regionen innerhalb einer FISH mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Sonden zu detektieren. Im vorliegenden Fall erfolgte eine Markierung der Sonden mittels direkter Markierung mit Hilfe des FISH TagTM DNA Multicolor Kit Alexa Fluor[®] dye combination (Invitrogen). Hierbei handelt es sich um eine schnelle Anwendung, bei der die Markierung der Sonde während einer Nick-Translation stattfindet. Bei der Nick-Translation handelt es sich um eine Reaktion bei der mit einer DNase zunächst Einzelstrangbrüche in die DNA eingefügt und von dort ausgehend durch die 5'-3'-Exonuklease-Funktion einer DNA-Polymerase Nukleotide abgebaut werden. Gleichzeitig erfolgt eine Auffüllung der entstandenen Lücke mit neuen Nukleotiden. Ein Teil der zur Reaktion hinzugefügten Nukleotide ist mit Reportermolekülen oder Fluorochromen gekoppelt. In der vorliegenden Arbeit wurden aminmodifizierte Nukleotide, die mit Amin-reaktiven Fluorochromen markiert wurden, eingebaut.

Die Durchführung erfolgte zum Nachweis der chromosomalen Regionen 11p15, 7p12-p11.2 und 7q32, die jeweils mit dem SRS assoziiert sind. Durch Verwendung einer Sonde für 11p15 und zusätzlich jeweils eine für die beiden anderen Regionen auf Chromosom 7 sollte die Detektion chromosomaler Interaktionen dieser Regionen erfolgen.

Durchführung

Als FISH-Präparat dienten Trophoblasten-Interphasekerne einer Plazenta von Neugeborenen mit normalen Geburtsmaßen. Plazentares Gewebe wurde zur Herstellung der Präparate direkt auf einem herkömmlichen Objektträger verstrichen. Zur Fixierung der Kerne wurden die Präparate für 30 min in 100%igem Ethanol inkubiert und anschließend bis zur Weiterverarbeitung in 70%igem Ethanol gelagert.

Die verwendeten Sondensequenzen wurden als fertige Klonierungskonstrukte in BAC-Klonen, transformiert in *E. coli*, von der Firma RZPD/Imagenes erworben (s. Tab. 3.3). Diese

Klone wurden als Agarstock ausgeliefert, sodass eine direkte Kultivierung der Bakterien auf Agarplatten, versehen mit dem entsprechenden selektiven Antibiotikum, möglich war. Hierzu wurde der Agarstock mit einer Impföse angestochen und die Bakterien nach dem 13-Strich-Verfahren auf der Platte ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 37°C. Anschließend wurde eine isoliert liegende Bakterienkolonie angeimpft und von diesem Klon eine 50 ml LB-Flüssigkultur (s. 3.2.5.3) mit Antibiotikum angesetzt. Auch hier erfolgte die Inkubation ÜN bei 37°C.

Zur Isolation der benötigten Plasmide wurde das Large-Construct Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Die isolierten Plasmide wurden anschließend als Ausgangsmaterial zur Herstellung der Sonden mittels Nicktranslation mit Hilfe des FISH TagTM DNA Multicolor Kit Alexa Fluor[®] dye combination verwendet. Bei der weiteren Durchführung der FISH mit dem Invitrogen-Kit wurden bei der Hybridisierung der Sonden auf dem Objektträger jeweils eine der beiden Sonden des Chromosoms 7 und die Sonde der Region 11p15 verwendet. Die beiden parallel hybridisierten Sonden waren jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, um bei der Visualisierung der Proben mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert Observer.Z1 der Firma Zeiss eine Unterscheidung möglich zu machen.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Axio Vision Rel 4.6 Software der Firma Zeiss. Bei der Aufnahme der Zellen wurden mehrere Bilder in einem Abstand von 0,24 µm zueinander in Z-Ebene aufgenommen, um die Detektion der Fluoreszenzsignale innerhalb des kompletten Zellkerns vornehmen zu können.

3.2.12 Associated Chromosome Trap Assay (ACT)

Der ACT-Assay dient dem Nachweis interchromosomaler Chromatin-Interaktionen. Nach der Fixierung des Chromatins mit 37%igem Formaldehyd erfolgt hierzu die Durchführung eines Restriktionsverdau (s. 3.2.5.4.1.1) zur Fragmentierung der genomischen DNA mit einem herkömmlichen Restriktionsenzym. Mit einer anschließenden Ligation dieser Fragmente erwartet man die Fusion eng benachbarter Chromatinregionen.

Zum Interaktionsnachweis unbekannter Chromatinregionen mit einer Zielregion erfolgt die zusätzliche Ligation von Linker-Sequenzen an die entstandenen Fragmente durch einen weiteren Verdau. Für die nachfolgende Detektion der Chromatin-Interaktoren wird eine PCR mit Hilfe von Primern durchgeführt, die komplementär zur Zielregion und Linkersequenz

sind. Die Sequenzierung der amplifizierten Fragmente gibt Aufschluss über eng mit der Zielregion assoziierte chromosomale Regionen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das bestehende Protokoll von Ling et al. (2006) in der Form modifiziert, dass ein spezifischer Nachweis einer Interaktion verschiedener Zielregionen erfolgen sollte. Hierzu erübrigt sich der Gebrauch einer Linker-Ligation. Stattdessen wurden im Rahmen der Detektion Primern verwendet, die komplementär zu den beiden potentiell interagierenden Chromatinregionen sind. Als Zielregionen wurden die Primer der CTCF-Bindestelle 6 innerhalb der *H19*-DMR, der maternal methylierten CpG-Insel 2 des Gens *GRB10* in 7p12-p11.2 und der maternal methylierten Promotor-Region des Gens *PEG1/MEST* in 7q32 verwendet. Ein Interaktionsnachweis wurde für die *H19*-DMR zu den beiden Regionen auf Chromosom 7 durchgeführt.

Reagenzien zur Herstellung des Lysispuffers

Lysis-Puffer	10 mM Tris-HCL, pH8,0
	10 mM NaCl
	1,2% NP-40
	1:100 Protease Inhibitor Cocktail „general use“ (SIGMA)

Durchführung

Die in 3.2.6.3 beschriebenen Trophoblastenzellkulturen wurden zur Durchführung des ACT-Assays verwendet. Der Versuch wurde parallel für die drei Enzyme *Bgl*II, *Eco*RI und *Hind*III durchgeführt. Für jeden der drei Versuchsansätze wurden 1×10^7 Zellen verwendet, die mit 2 ml Trypsin-EDTA von den Kulturschalen abgelöst und mit Hilfe einer Neubauer-Kammer gezählt wurden. Die Zellen wurden in 40 ml DMEM/10%FCS aufgenommen und mit 1,7 ml 37%igem Formaldehyd für 10 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei 3.500 rpm herunterzentrifugiert und das Zellpellet in 40 ml Lysis-Puffer inklusive Protease Inhibitor (1:100) für 90 min bei 4°C lysiert. Beim nachfolgenden Zentrifugationsschritt für 10 min bei 2.500 rpm und 4°C sammelten sich im Pellet die Zellkerne, die in 1 ml 1x NEB Puffer und 30 µl 10% SDS für 1 h bei 37°C inkubiert wurden. Nach Zugabe von 90 µl 20%igem Triton X-100 und Inkubation bei 37°C für 1 h erfolgte der Verdau des Chromatins mit einem der drei verwendeten Enzyme. 110 µl der Chromatinlösung wurden hierfür mit 90 µl 1x NEB-Puffer und 600 U des entsprechenden Enzyms gemischt.

Der Verdau erfolgte bei 37°C ÜN. Durch Zugabe von 38 µl 10%igem SDS und einer Inkubation für 20 min bei 65°C wurden die Restriktionsenzyme inaktiviert. Das Chromatin wurde mit 7 ml 1x Ligationspuffer (New England Biolabs) und 360 µl 20%igem Triton X-100 bei 37°C für 1 h behandelt. Bei einer Temperatur von 16°C wurden 50 µl einer 400 U/µl T4 DNA Ligase (New England Biolabs) hinzugefügt und bei 16°C für 4 h und RT für 30 min gehalten. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µg Proteinase K und Inkubation bei 65°C ÜN. Nach einer Behandlung des Ansatzes mit 5 µg RNase A bei 37°C für 30 min wurde das Chromatin mittels einer Phenol/Chloroform-Extraktion (Chomczynski et al., 2006) aufgereinigt und in 150 µl Aqua dest. gelöst. Nach einer zusätzlichen Aufreinigung von zweimal 75 µl mit dem QIAquick® PCR PurificationKit (Qiagen) wurden jeweils 2 µl der in 50 µl eluierten DNA für die Amplifikation verwendet. Die PCR erfolgte mit der Hot Star Taq-DNA Polymerase (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 6.12 (s. 6. Anhang) aufgeführt. Dabei wurden jeweils Primer der *H19*-DMR und entweder der Region um *GRB10* oder *PEG1/MEST* miteinander verwendet (s. Tab. 3.11). Um keine möglichen Ligationskonstrukte der Regionen zu übersehen, wurden die verwendeten Primer jeweils als Vorwärts- und als Rückwärtsprimer genutzt. Mit 1 µl des Produkts der ersten PCR erfolgte eine zweite PCR mit weiter 5'-lokalisierten Primern (s. Tab. 3.11). Dabei handelt es sich um eine so genannte Nested-PCR, die zur spezifischeren Amplifikation durchgeführt wurde.

Tab. 3.11: Primerkombinationen für die Ausgangs- und Nested-PCR des ACT-Assays

PCR	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
1	<i>H19</i> -SpezPrimer-1F	ACT- <i>GRB10</i> -1R
2	<i>H19</i> -SpezPrimer-1F	ACT- <i>MEST</i> -1R
3	ACT- <i>GRB10</i> -1F	<i>H19</i> -SpezPrimer-1R
4	ACT- <i>MEST</i> -1F	<i>H19</i> -SpezPrimer-1R
Nested-PCR		
1	<i>H19</i> -SpezPrimer-2F	ACT- <i>GRB10</i> -2R
2	<i>H19</i> -SpezPrimer-2F	ACT- <i>MEST</i> -2R
3	ACT- <i>GRB10</i> -2F	<i>H19</i> -SpezPrimer-2R
4	ACT- <i>MEST</i> -2F	<i>H19</i> -SpezPrimer-2R

Die Produkte wurden über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und nach einer Gel-Extraktion mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben entweder sofort

sequenziert (s. 3.2.2) oder, bei Vorliegen vieler Produkte innerhalb einer PCR, in TOPO TA-Vektoren subkloniert (s. 3.2.5.1). Nach der Klonierung der Produkte wurde mit jeweils zehn Klonen eine Kolonie-PCR (s. 3.2.5.1.1) durchgeführt und diese anschließend einer Sequenzierung unterzogen. Durch Vergleich der Sequenzen in NCBI- und UCSC-Datenbanken wurde die Herkunft der Ligationsprodukte im Genom bestimmt.

3.2.13 Microarray

Mit Hilfe der Microarray-Technologie ist es möglich die Kopienzahl spezifischer DNA-Sequenzen innerhalb des Genoms in hoher Auflösung zu untersuchen. Die Methode stellt einen Übergang zwischen der konventionellen Zytogenetik und der Molekulargenetik dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Affymetrix GeneChip® Human Mapping 500K Assay der Firma Affymetrix verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-Array, der sich der Analyse von ca. 500.000 SNPs als Marker bedient. Die verwendeten SNP-Marker sind auf zwei Chips verteilt und im Genom in einem durchschnittlichen Abstand von ca. 5,8 kb voneinander entfernt. Mit jedem der beiden Chips werden 250.000 SNPs nachgewiesen. Bei den beiden Chips unterscheidet man die Verwendung des Restriktionsenzym (*NspI* und *StyI*) bei der Vorbehandlung der DNA.

Zur Durchführung des Arrays werden jeweils 250 ng DNA mit *NspI* bzw. *StyI* verdaut. Die daraus resultierenden Fragmente unterschiedlicher Länge besitzen einen Überhang von vier Basenpaaren. An diese Überhänge werden Adaptoren ligiert, die in ihrer Sequenz komplementär zu einem Universalprimer-Paar sind. Mit diesem Primer werden die erzeugten Fragmente in einer PCR amplifiziert und anschließend aufgereinigt. Durch Zerschneiden der Produkte mit dem Enzym DNase I erhält man Fragmente von weniger als 180 bp. Eine terminale Nukleotidyltransferase versieht die DNA mit einem Biotin-Labeling, das bei einer späteren Detektion mit einem fluoreszenzmarkierten Streptavidin nachgewiesen werden kann. Zunächst erfolgt jedoch die Hybridisierung der Sonden auf die beiden Chips. Hierbei binden je nach Fragment unterschiedliche Mengen an die komplementären Oligonukleotide auf den einzelnen Feldern des Chips. Dies ist abhängig von der zuvor amplifizierten Menge des Fragments je nach Ausgangskonzentration. Nach Detektion der Fragmente mit Hilfe eines geeigneten Scanners können die unterschiedlichen Fluoreszenz-Intensitäten gemessen, mit der entsprechenden Software analysiert und Abweichungen bestimmt werden. Referenz-

Kollektive dienen zur Einstufung normaler unauffälliger Intensitäten und werden zur Berechnung herangezogen.

Die Ergebnisse werden mit Datenbanken und den Angaben zur genauen Lokalisation des jeweiligen SNP-Markers verglichen und mit möglichen CNVs (copy number variations) abgeglichen. Hierbei handelt es sich um Polymorphismen der Kopienanzahl einer bestimmten genomischen Region, die nicht zu pathogenen Imbalancen führen.

Durchführung

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Etablierung der Microarray-Technologie an einer geringen Anzahl von Patienten und Kontrollpersonen.

Es wurde der Affymetrix GeneChip[®] Human Mapping 500K Assay der Firma Affymetrix verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die Hybridisierung der Proben und Scannen der Fluoreszenzintensität der Chips wurde von der Array-Core-Facility am IZKF „BIOMAT“ des Universitätsklinikums der RWTH Aachen durchgeführt. Die biometrische Auswertung der Rohdaten erfolgte am Institut für Molekularbiologie der Universität Zürich durch Herrn Dr. Michael Baudis. Zur genaueren Analyse der Ergebnisse wurde die UCSC Datenbank herangezogen.

3.2.14 Datenbanken-Recherche NCBI/Aceview und UCSC

Zur Expressionsanalyse der varianten Formen von *H19* wurden die mutierten Allele der Patienten SR17K, SR81K und SR93K in HEK-Zellen transfiziert (s. 3.2.7) und nach RNA-Isolation (s. 3.2.8), RT-PCR (s. 3.2.9) und PCR an cDNA mit spezifischen *H19*-Primern zur genaueren Analyse sequenziert. Um die detektierten Transkripte einer genomischen Region zuordnen zu können wurde die Sequenzen innerhalb von NCBI- und UCSC-Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> und <http://genome.ucsc.edu>) geblastet.

Die analysierten Transkripte wurden in der Aceview-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly>) mit bereits beschriebenen alternativen Transkripten verglichen und somit ermittelt, ob es sich um bisher unbekannte Spliceformen handelt.

Auch für die Analyse der erzeugten Ligationsprodukte nach der PCR des ACT-Assays und bei der Microarray-Analytik wurden die Produkte in der NCBI- und UCSC-Datenbank mit

dem menschlichen Genom geblastet und somit die Herkunft der einzelnen Fragmentabschnitte bestimmt.

3.2.15 Untersuchung möglicher Splice-Enhancer mittels der ESEfinder-Software

Für den richtigen Ablauf des Splicings der prä-mRNA zur reifen mRNA sind neben den Konsensusmotiven am Intron-Exon-Übergang auch weitere Faktoren beteiligt, die an bestimmte Erkennungssequenzen (ESEs = *exonic-splicing-enhancer*) binden und das Splicen fördern. Zu diesen Splicingfaktoren zählen die so genannten SR-Proteine, die an die transkribierende RNA-Polymerase II binden und den Zusammenbau des Spliceosoms einleiten. Exon-Splice-Enhancer-Regionen variieren je nach prä-mRNA weshalb jede prä-mRNA unterschiedliche Mitglieder der SR-Proteinfamilie bindet.

Mutationen, die eine ESE zerstören oder erzeugen können so das Splicing hemmen oder verstärken. Mittels der ESEfinder Software (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese finder.cgi?process=home>) ist es möglich, eine Sequenz auf das Vorhandensein einer ESE für die SR-Proteine SF2/ASF, SC35, SRp40 und SRp55 hin zu untersuchen. Hier wird ein *score* dafür bestimmt, wie hoch die Wahrscheinlichkeit für die Bindung eines SR-Proteins ist.

In der vorliegenden Studie wurden sowohl die Wildtyp- als auch die varianten Sequenzen des *H19*-Gens, die bei den Patienten SR17K, SR81K und SR93K ermittelt wurden, auf die Existenz der Erkennungsmotive untersucht.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zu (epi)genetischen Veränderungen in 11p15 bei Patienten mit SRS

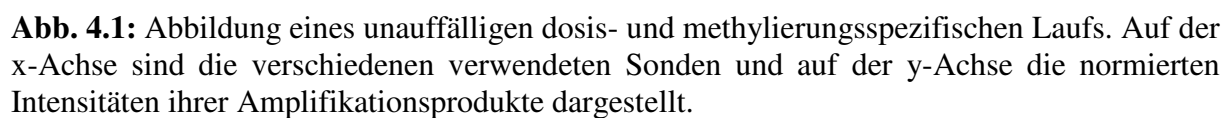
Bei Patienten mit SRS sind Veränderungen innerhalb der Region 11p15, wie z.B. maternale Duplikationen und Inversionen, bereits seit längerem bekannt (als Review s. Eggermann et al., 2008a). Die Arbeitsgruppe um Gicquel et al. (2005) erbrachte zu Beginn der vorliegenden Arbeit zusätzlich den Nachweis, dass ein großer Anteil von Patienten mit SRS eine Hypomethylierung der ICR1 in der elterlich geprägten Region 11p15 aufweist. Zur genaueren Charakterisierung und Frequenzbestimmung dieser beschriebenen Auffälligkeiten und zur Detektion bisher nicht nachgewiesener Veränderungen, wurden in der vorliegenden Arbeit Analysen bei 72 SRS-Patienten mit typischem Phänotyp und 188 Patienten der Routinediagnostik mit klinischen Merkmalen eines SRS durchgeführt.

4.1.1 Häufigkeitsbestimmung von Hypomethylierungen der ICR1 in 11p15 beim SRS mit MS-MLPA

Zu Beginn des Nachweises von Methylierungsdefekten in 11p15 bei Patienten mit SRS wurde das aufwendige Verfahren des Southern-Blots (Gicquel et al., 2005) zur Analyse genutzt. Mit Etablierung der neuen Methode der MS-MLPA (s. 3.2.4.3.1) konnte nun mit einem sensitiveren System eine genauere Frequenzbestimmung von Hypomethylierungen der ICR1 bei SRS-Patienten etabliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst 72 Patienten mit typischen Merkmalen eines SRS und 188 Patienten der laufenden Routine-Diagnostik und Verdacht auf SRS zur Bestimmung der Häufigkeit von Methylierungsdefekten innerhalb von 11p15 analysiert.

Als Kontrollkollektiv dienten 15 gesunde Personen, sowie zwei SRS-Patienten mit bekannter Duplikation in 11p15 und ein Patient mit BWS und Hypomethylierung der ICR2 als Positivkontrollen. Bei keiner der gesunden Kontrollpersonen konnte ein MLPA-Muster nachgewiesen werden, das auf einen Methylierungsdefekt oder eine Änderung der Kopienzahl innerhalb von 11p15 hindeuten würde (s. Abb. 4.1). Die Befunde der Patienten mit BWS und Hypomethylierung, sowie der SRS-Patienten mit Duplikation in 11p15 konnten innerhalb der MLPA-Analysen bestätigt werden.



Eine Hypomethylierung der ICR1 mittels MS-MLPA wurde bei 28 der restlichen 63 (44,4%) SRS-Patienten (Eggermann et al., 2008c) und bei 28 der restlichen 183 (15,3%) Routine-Patienten ohne UPD(7)mat nachgewiesen (s. Abb. 4.2). Hierbei konnte je nach Mosaikzustand ein breites Muster der Intensität des Methylierungsdefekts festgestellt werden.

Im Gesamtkollektiv lag somit eine Häufigkeit der Hypomethylierungen von 38,8% (28/72) bei den SRS-Patienten und von 14,9% (28/188) bei den Patienten der Routine-Diagnostik vor.

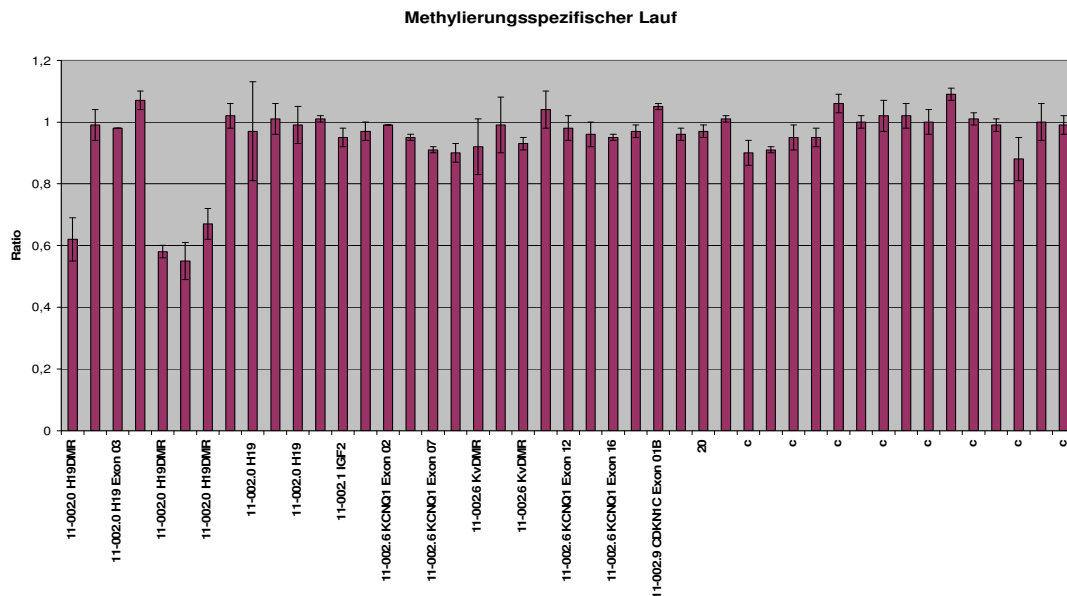


Abb. 4.2: Abbildung eines auffälligen methylierungsspezifischen Laufs mit Hypomethylierung der ICR1 in 11p15. Die methylierungsspezifischen Sonden der ICR1 zeigen eine erniedrigte Amplifikation im Vergleich zu den restlichen Sonden an.

In vorangegangenen Studien wurden bereits 43 der 63 typischen SRS-Patienten ohne UPD(7)mat mit Hilfe des Southern-Blot-Verfahrens auf die beschriebenen Methylierungsdefekte hin untersucht (Eggermann et al., 2006). Bei 16 dieser 43 Patienten (37,2%) konnte eine Hypomethylierung bei Verwendung des Southern-Blots und bei 22 der 43 (51,2%) DNA-Proben während der MLPA detektiert werden (Eggermann et al, 2008). Mit Hilfe der MS-MLPA wurde die Detektionsrate somit stark erhöht.

Eine genauere Analyse der Methylierungsbefunde nach der MLPA machte deutlich, dass die Patienten mit negativem Southern-Blot- und positivem MLPA-Ergebnis (n=6) eine mildere Hypomethylierung aufwiesen als diejenigen Patienten mit positivem Ergebnis in beiden Fällen (n=16) (Eggermann et al. 2008).

4.1.2 Untersuchung der Region 11p15 nach bisher unbekannten (Epi)mutationen

Für das klinisch und genetisch gegensätzliche Großwuchssyndrom BWS sind neben Methylierungsdefekten innerhalb der ICR1 auch Hyomethylierungen der zentromerischen ICR2, maternale Mikrodeletionen der *H19*-DMR sowie paternale UPDs des Chromosoms 11 beschrieben. Somit war es Ziel der Untersuchungen von Patienten mit SRS die elterlich

geprägte Region 11p15 näher nach diesen bisher unbeschriebenen (epi)genetischen Veränderungen zu untersuchen.

Da die verwendete MS-MLPA eine Erfassung sowohl der ICR1 als auch der ICR2 ermöglicht, wurde diese zur (Epi)mutationsanalyse bei den 72 SRS-Patienten sowie den 188 Patienten der SRS-Routine-Diagnostik verwendet. Auch hier dienten die oben beschriebenen (4.1.1) Kontrollpersonen zur Validierung der Methode. Ein Patient mit isolierter maternaler Duplikation der ICR2 (s. 4.2) diente als Positivkontrolle des Verfahrens.

Während die Kontrollpersonen ein normales unauffälliges MS-MLPA Ergebnis zeigten, konnte für die Positivkontrolle eine maternale Duplikation der ICR2 bestätigt werden. Dieses Ergebnis spiegelte sich in einer Erhöhung der Intensität aller ICR2-Sonden im Dosislauf, sowie der methylierungssensitiven ICR2-Sonden im methylierungsspezifischen Ansatz wieder. Die verstärkte Intensität der methylierungsabhängigen Sonden im Methylierungslauf erklärt sich dadurch, dass in der ICR2 das maternale Allel methyliert vorliegt und es sich hierbei um eine maternale Duplikation handelt.

Keiner der Patienten mit SRS zeigte ein verändertes Muster innerhalb der MS-MLPA, das auf eine Hypermethylierung der ICR2 in 11p15 hindeuten würde. Auch paternale Mikrodeletionen und maternale UPDs des Chromosoms 11, sowie andere Auffälligkeiten im MLPA-Muster konnten bei diesem Patienten-Kollektiv nicht detektiert werden.

4.1.3 Ausschluss allgemeiner Hypomethylierungen beim SRS

Für verschiedene Imprinting-Syndrome, u.a. für das BWS, die mit Hypomethylierungen einer spezifischen elterlich geprägten Region assoziiert sind, sind bei einigen Patienten zusätzliche Methylierungsdefekte anderer unterschiedlich methylierter Loci beschrieben (s. 2.2.2.2.3). Die betroffenen Patienten weisen neben den für das Syndrom typischen phänotypischen Merkmalen weitere unspezifische Auffälligkeiten auf. Da es sich auch beim SRS um ein Hypomethylierungssyndrom mit einem heterogenen Phänotyp handelt, wurden in der vorliegenden Studie 32 Patienten mit SRS auf Methylierungsdefekte in anderen elterlich geprägten Regionen hin untersucht. Hierbei handelte es sich um 10 SRS-Patienten mit UPD(7)mat sowie 22 Patienten mit Hypomethylierung der ICR1. Vor Beginn der Untersuchungen wurde für die Patienten mit UPD(7)mat eine Hypomethylierung der ICR1 und für die Patienten mit Hypomethylierung eine UPD(7)mat ausgeschlossen.

Bei den analysierten Loci handelt es sich um die maternal methylierten Regionen 6q24 und die ICR2 in 11p15, sowie die paternal methylierte Region 14q32. Für 6q24 und 14q32 wurden MS-PCRs (s. 3.2.4.2.1.2) und für die ICR2 in 11p15 die MS-MLPA (s. 3.2.4.3.1) durchgeführt.

Bei keiner der verwendeten Patienten-Proben wurde ein verändertes Methylierungsmuster der untersuchten Regionen detektiert. Zur Validierung der Methoden wurden Positivkontrollen verwendet, für die ein bekannter Methylierungsdefekt in den untersuchten Loci bestätigt werden konnte.

4.1.4 11p15-Untersuchungen bei Patienten mit isolierter Wachstumsretardierung

Zum Nachweis, dass es sich bei der Hypomethylierung der ICR1 um eine epigenetische Veränderung handelt, die spezifisch mit dem SRS assoziiert ist, erfolgte bei den oben aufgeführten Analysen mittels MS-MLPA parallel die Untersuchung von 20 Patienten mit isolierter intrauteriner Wachstumsretardierung (IUGR), 30 Patienten mit isolierter IUGR und postnataler Wachstumsretardierung (PGR), sowie 58 weiteren Patienten mit Wachstumsretardierung und weiteren klinischen Auffälligkeiten, die nicht mit dem SRS assoziiert sind (s. 3.1.7).

Bei keinem der untersuchten Patienten konnte eine Hypomethylierung der ICR1 nachgewiesen werden (Schönherr et al., 2006; Eggermann et al., 2008c). Des Weiteren wurden maternale Duplikationen und UPD(11)mat mit Hilfe der Mikrosatelliten-Analyse ausgeschlossen. Bei den verwendeten Mikrosatelliten-Markern handelte es sich um D11S1984, D11S4088, D11S4046, D11S1758 sowie D11S4181 (s. Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Anzahl der untersuchten Patienten und Häufigkeiten der 11p15 Veränderungen

Patienten	Anzahl der untersuchte Patienten	Anzahl der Patienten zur Mikrosatelliten-Analyse	Anzahl der Patienten mit Hypomethylierung der ICR1
Isolierte IUGR	20	20	0/20
Isolierte IUGR + PGR	30	-	0/30
IUGR + PGR + weitere SRS-unspezifische Merkmale	58	56	0/23

4.1.5 Bestimmung des genauen Methylierungsmusters der CTCF-Bindestelle 3

Zur Darstellung eines detaillierteren Methylierungsmusters der H19-DMR innerhalb der ICR1 erfolgte die Etablierung der Bisulphit-Sequenzierung der *CTCF*-Bindestelle 3 in 11p15 (s. 3.2.4.2.2). Hierzu wurden die drei SRS-Patienten SR27, SR30 und SR40 sowie die zwei gesunden Kontrollpersonen DR1 und DR4 der Bisulphitsequenzierung unterzogen. Bei SR27K und SR30K handelte es sich um zwei der Patienten, die in der Southern-Blot- und der MLPA-Analyse diskrepante Ergebnisse aufwiesen. Für SR27K und SR30K war ein normaler Befund bei der Southern-Blot-Analyse und eine leichte Hypomethylierung der ICR1 bei der MLPA nachgewiesen worden. Bei SR40K war bei beiden Verfahren ein positiver Befund für einen Methylierungsdefekt erhoben worden.

Bei den gesunden Kontrollen DR1 und DR4 zeigt die Sequenzierung ein normales Methylierungsmuster von vier unmethylierten zu fünf methylierten Klonen bei DR1 und von fünf zu fünf bei DR4 (s. Abb. 4.3).

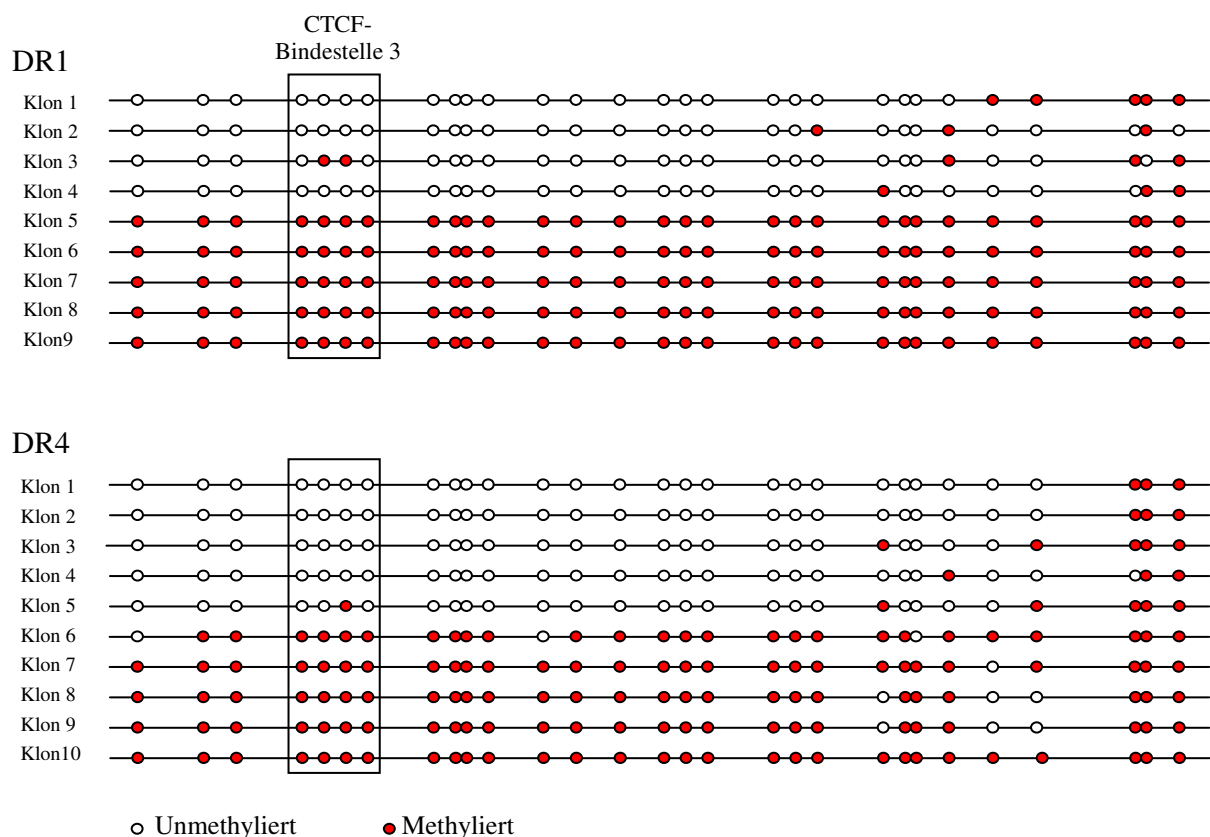


Abb. 4.3: Darstellung der Methylierungszustände einzelner sequenzierter Klone von DR1 und DR4. Jeder Kreis stellt ein unterschiedlich methyliertes Cytosin innerhalb des sequenzierten Abschnitts dar.

Die Sequenzierung des SRS-Patienten SR27K zeigt eine minimale Hypomethylierung von sechs unmethylierten zu drei methylierten Klonen. Bei SR30K zeigt sich ein normales Methylierungsmuster von sieben methylierten zu sechs unmethylierten und bei SR40K eine starke Hypomethylierung bei zehn unmethylierten von zehn sequenzierten Klonen (s. Abb. 4.4).

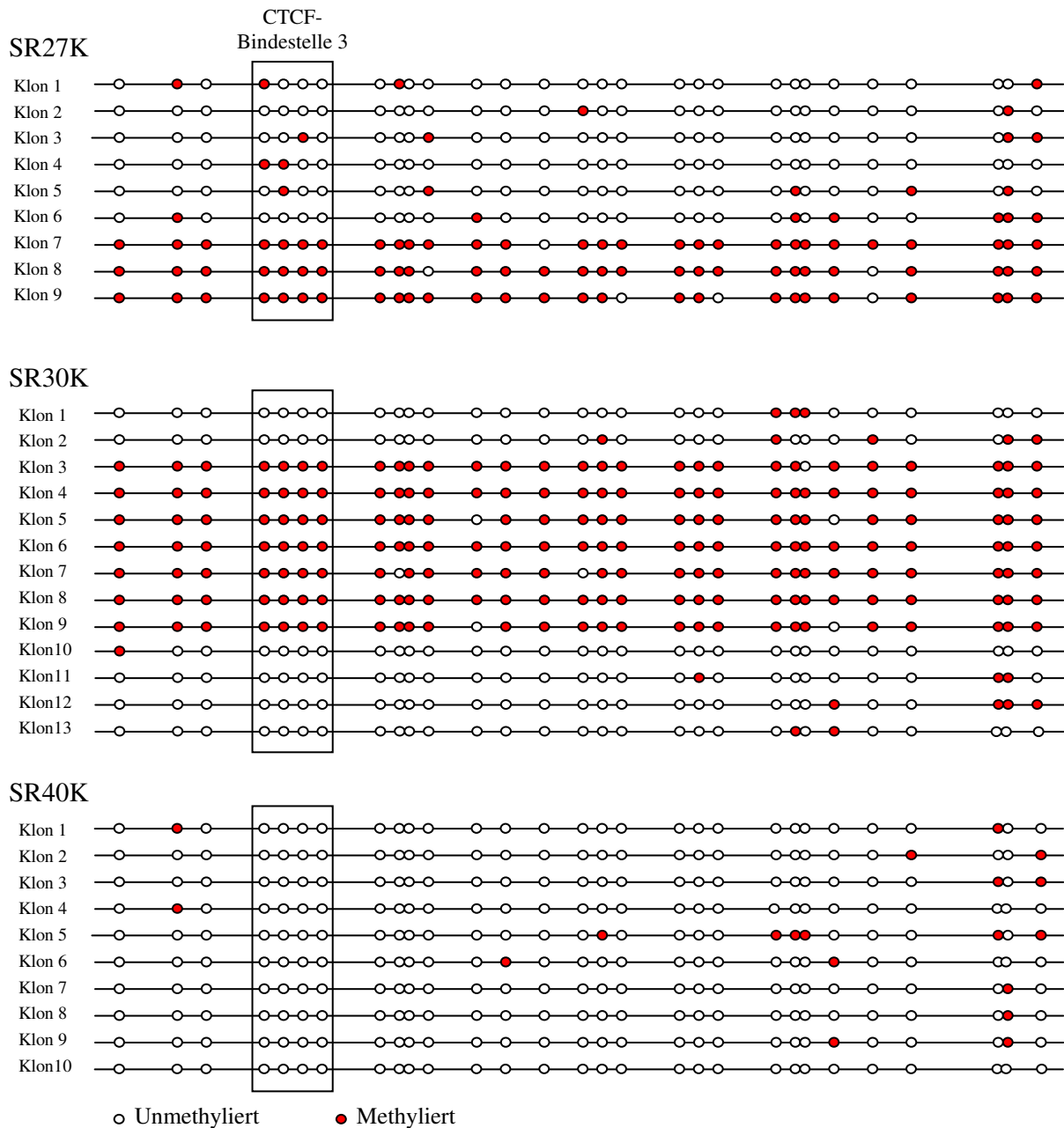


Abb. 4.4: Darstellung der Methylierungszustände einzelner sequenzierter Klone von SR27K, SR30K und SR40K. Jeder Kreis stellt ein unterschiedlich methyliertes Cytosin innerhalb des sequenzierten Abschnitts dar.

4.1.6 Identifizierung und Charakterisierung einer maternalen Duplikation in 11p15

Während der Untersuchung von Patienten mit Verdacht auf SRS aus der laufenden Routinediagnostik wurde durch Anwendung der MLPA ein Patient mit SRS identifiziert (LE), der eine deutliche Dosiserhöhung sowohl der ICR1 als auch der ICR2 aufwies. Da auch im methylierungssensitiven Ansatz eine verstärkte Intensität der methylierungsspezifischen Sonden der ICR2 und eine verringerte Intensität der Sonden der ICR1 vorlag, deuteten diese Ergebnisse auf eine maternale Duplikation in 11p15 hin. Zur Bestätigung und genaueren Charakterisierung dieser Duplikation wurden Mikrosatelliten-Analysen (s. 3.2.4.1) der chromosomalen Region 11p15 sowohl bei dem Patienten LE als auch bei seinen Eltern durchgeführt. Die verwendeten Mikrosatelliten-Marker sind in Tabelle 6.3 (s. 6. Anhang) aufgeführt.

Die Ergebnisse der Mikrosatelliten-Analyse bestätigen den Verdacht einer maternalen Duplikation, da bei dem Index-Patienten entweder eine verstärkte Intensität eines der beiden maternalen Allele nachgewiesen werden konnte, oder beide maternalen Allele vorlagen (s. Tab. 4.2). Beide Eltern zeigen ein unauffälliges Muster der Mikrosatelliten-Marker. Das Ausmaß der Duplikation bei dem Patienten kann durch die verwendeten Marker auf ca. 9,0-11,0 Mbp festgelegt werden.

Tab. 4.2: Ergebnisse der Mikrosatelliten-Analyse bei Familie LE. Die Zahlenwerte geben die polymorphen Längen (bp) der Allelzustände der einzelnen Mikrosatelliten-Marker an.

Marker	Entfernung von 11pter (Mbp)	M4951 Vater	M4952 Mutter	M4953 Patientin LE	Informativität
D11S4046	1,92	185-195	187-193	185-187-193	maternales Allel dupliziert
<i>H19</i>	1,972-1,975				
<i>IGF2</i>	2,110-2,116				
D11S1318	2,29	118-124	118-134	118-118-134	Duplikation
D11S4088	2,71	212-233	212-212	212-212-233	Duplikation
D11S1758	4,7	240-242	244-244	242-244-244	maternales Allel dupliziert
D11S4188	9,03	110-110	108-112	108-110-112	maternales Allel dupliziert
D11S875	10,99	104-104	116-118	104-116	keine Duplikation
D11S1334	12,92	135-135	132-135	132-135	keine Duplikation

Bei weiterführenden zytogenetischen Chromsomen-Analysen, die von der Medizinischen Genetik Tübingen durchgeführt wurden, konnte bei der klinisch unauffälligen Mutter des Patienten LE eine balancierte Translokation der Chromosomen 11 und 15 dargestellt werden.

Bei der Chromosomen-Analyse des Indexpatienten LE zeigte sich, dass er von seiner Mutter sowohl das derivative Chromosom 15 mit zusätzlichem Material von Chromosom 11, als auch das normale Chromosom 11 geerbt hat. Es ergibt sich ein unbalanciertes Verhältnis von Chromosom 11 Material und somit eine maternale Duplikation.

4.2 Genauere Charakterisierung einer isolierten maternalen ICR2-Duplikation

Während einer vorangegangenen Studie zur Detektion von maternalen Duplikationen in 11p15 bei 90 Patienten mit Wachstumsretardierung (Schönherr, 2005) wurde ein SRS-Patient (FN) identifiziert, der eine isolierte maternale Duplikation von ca. 0,7 Mb der ICR2 in 11p15 aufwies. Hierbei handelt es sich um den ersten beschriebenen Patienten mit SRS, der eine Duplikation ausschließlich dieser Region aufweist. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Duplikation genauer charakterisiert, indem die Herkunft sowie die Entstehungsweise der Duplikation bei der unauffälligen Mutter sowie den mütterlichen Großeltern untersucht wurden. Des Weiteren wurden Expressionsanalysen verschiedener Gene innerhalb der betroffenen Region durchgeführt, um ein besseres Verständnis der pathogenen Mechanismen erzielen zu können.

4.2.1 Segregationsanalysen bei Familie FN

Zur Bestimmung des genauen Vererbungsmodus und der Entstehung der Duplikation wurden in der vorliegenden Studie Mikrosatelliten-Analysen für die Mutter und den Indexpatienten durchgeführt, die die Ergebnisse von Schönherr (2005) vervollständigen.

Hierdurch konnte die Duplikation proximal durch die beiden Marker 11-2305 und 11-2357 sowie distal durch die Marker 11-3117 und 11-3396 eingegrenzt werden (s. Tab. 4.3). Es ergibt sich somit ein Duplikationsausmaß von 0,76-1,0 Mbp bei dem Indexpatienten und seiner Mutter.

Des Weiteren wurden dieselben Mikrosatelliten-Analysen an DNA der mütterlichen Großeltern durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten für beide Großeltern ein unauffälliges Muster aller informativen Mikrosatelliten-Markern (s. Tab. 4.3) und somit einen Duplikationsausschluss im verwendeten Zellsystem.

Wie beispielsweise der Marker 11-2357 verdeutlicht liegt bei der Mutter des Indexpatienten eine väterliche Herkunft des duplizierten Materials vor. Dies lässt darauf schließen, dass die

Duplikation *de novo* in den großväterlichen Keimzellen entstanden sein muss. Die Mikrosatelliten-Marker des Indexpatienten FN verdeutlichen, dass es sich bei seiner Duplikation sowohl um großväterliches als auch großmütterliches Material handelt. Dieses Vererbungsmuster wird u.a. durch die Analyse des Markers D11S4088 gezeigt (s. Tab. 4.3). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei der Mutter eine meiotische Rekombination der beiden homologen Chromosomen stattgefunden hat und somit auf einem Chromosom genomisches Material ihrer beiden Eltern vorzufinden ist (s. 5.2).

Tab. 4.3: Ergebnisse der Mikrosatelliten-Analyse bei Familie FN. Die Zahlenwerte geben die polymorphen Längen (bp) der Allelzustände der einzelnen Mikrosatelliten-Marker an. Der Abschnitt mit fett gedruckten Buchstaben markiert den minimalen duplizierten Bereich.

<i>Marker</i>	Entfernung von 11pter (Mb)	Großvater	Großmutter	Mutter	Indexpatient FN
D11S1984	1.53	2-2	3-4	2-3	1-2
D11S4046	1.93	2-5	1-4	1-2	2-3
<i>H19</i>	1.972-1.975				
<i>IGF2</i>	2.110-2.116				
D11S1318	2.29	-	-	1-2	2-3
11-2305	2.30	1-2	2-3	1-2	1
11-2357	2.35	1-3	2-5	1-2-3	1-3-4
<i>KCNQ1</i>	2.439-2.826				
11-2427	2.42	3-4	2	2-4-4	1-2-4
D11S4088	2.71	1	2-3	1-1-3	1-3-4
11-2820	2.82	2	1-3	1-2-2	1-2-2
11-2849	2.85	2-3	2-3	2	1-2-2
<i>CDKN1C</i> (PAPA repeat)	2.861-2.863	A-A	B-B	A-A-B	A-B-B
11-31174	3.11	2-4	2-3	2-4-4	1-2-4
11-3396	3.39	1-3	3	3	2-3
11-3648	3.64	2-3	1-1	1-2	1-3
11-3800	3.80	-	-	1-2	2-2
11-3973	3.97	-	-	1-2	1-2
D11S1758	4.70	2-3	2-3	2-3	1-2
D11S4181	4.73	2-4	3-5	3-4	1-3

Mit Durchführung einer MS-MLPA (s. 3.2.4.3.1) bei dem Patienten FN und seiner Mutter MN konnte die Duplikation bestätigt werden. Es zeigte sich eine Intensitätserhöhung der ICR2 spezifischen Sonden im Dosislauf sowie der methylierungsspezifischen Sonden der ICR2 im methylierungssensitiven Ansatz, die sich durch die Methylierung des maternalen Allels in der ICR2 begründet.

Bei einer Untersuchung der drei unauffälligen Schwestern von MN konnte mittels Mikrosatelliten-Diagnostik nachgewiesen werden, dass keine der Schwestern die Duplikation geerbt hatte.

Nach einer weiteren Schwangerschaft von MN erfolgte eine Testung des normalwüchsigen und klinisch unauffälligen Kindes (LN). Hierbei konnte eine Vererbung der Duplikation an LN ausgeschlossen werden.

4.2.3 Expressionsanalyse des Gens *CDKN1C*

Innerhalb der Duplikation bei dem Patienten FN und seiner Mutter ist das Gen *CDKN1C* lokalisiert. Hierbei handelt es sich um einen maternal exprimierten, negativen Regulator der Zellproliferation und des Wachstums, sodass eine Duplikation dieses genomischen Materials und somit eine Erhöhung seiner Expression eine direkte Relevanz für das SRS haben könnte. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie Untersuchungen durchgeführt, die eine mögliche Veränderung der Expression dieses Gens bei dem Patienten FN erfassen sollen.

Zur Expressionsanalyse wurde der 12 bp (PAPA) Deletions-Polymorphismus innerhalb des Exon 2 von *CDKN1C* verwendet. Nach Amplifikation des Fragments mit genomischer DNA der beiden Patienten (Primerangaben s. Tab. 6.1 in 6. Anhang), Auftrennung des PCR-Produkts nach seiner Länge auf einem PAA-Gel und anschließender Silberfärbung (s. 3.2.3.1), konnten bei dem Patienten FN und seiner Mutter zwei Banden detektiert und somit eine Heterozygotie für den Polymorphismus nachgewiesen werden.

Auf genomischer Ebene konnten, aufgrund der Duplikation jeweils eines der beiden Allele, unterschiedliche Intensitäten in der Bandenstärke der beiden Allele detektiert werden (s. Abb. 4.5).

Bei Verwendung von cDNA aus Lymphozyten der beiden Patienten und Durchführung der gleichen Analyse lässt die Intensität der Banden eine Aussage zur Expression der Allele zu. Sowohl bei der Mutter als auch bei dem Patienten FN zeigte die Analyse der cDNA weiterhin ein Vorhandensein beider Banden, jedoch ohne Unterschied in der Intensität (s. Abb. 4.5).

Da *CDKN1C* elterlich geprägt vorliegt und normalerweise nur vom maternalen Allel exprimiert wird, weist dieses Ergebnis darauf hin, dass bei dem Patienten FN eine Expression beider unterschiedlichen mütterlichen Allele stattfindet, die bei ihm, bedingt durch die mitotische Rekombination der homologen großelterlichen Chromosomen bei der Mutter, gemeinsam auf einem Chromosom lokalisiert sind.

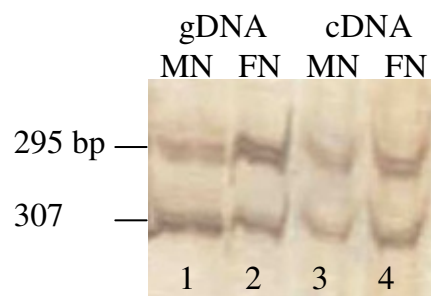


Abb.4.5: Darstellung des PAPA-Polymorphismus nach Auftrennung des PCR-Produkts auf einem PAA-Gel und anschließender Silberfärbung. Banden 1 und 2 stellen die Produkte der genomischen DNA des Patienten FN und seiner Mutter dar. Die Banden 3 und 4 entsprechen den cDNA-Produkten.

Bei der Mutter erklärt sich das Ergebnis möglicherweise dadurch, dass, obwohl das paternale Allel normalerweise nicht exprimiert wird, bedingt durch eine verschobene Inaktivierung mancher elterlich geprägter Gene in Lymphozyten (Algar et al., 2000), eine milde Expression auch des paternalen Allels möglich ist und diese durch die Duplikation zusätzlich verstärkt wird.

4.2.4 Expressionsanalyse des Gens *KCNQ1*

Zur weiteren Charakterisierung der Duplikation und ihren Auswirkungen wurde bei Patient FN (E02-05) und seiner Mutter (E01-05) eine Expressionsanalyse des Gens *KCNQ1* durchgeführt, das ebenfalls innerhalb der duplizierten Region lokalisiert ist.

Hier wurde eine quantitative Real-Time PCR an cDNA aus peripheren Lymphozyten des Blutes durchgeführt (s. 3.2.10.2). Zur Quantifizierung wurden die ermittelten Werte des Ziel- und Referenz-Fragments miteinander verrechnet. Als Referenzgen diente das Haushaltsgen *TBP*. Die Werte des Referenz-Fragments dienten als externer Standard. Die Werte des Ziel-Fragments wurden durch die des Referenz-Fragments dividiert. Als Kontrollen dienten drei Patienten ohne Duplikation in 11p15. Nach Berechnung des Mittelwertes der Kontrollen für jeden Lauf wurden die Werte von FN und seiner Mutter mit diesen verrechnet.

In Abbildung 4.6 sind die normierten Ergebnisse aller drei Läufe als Diagramm dargestellt. Während die Mutter eine Expression von *KCNQ1* aufweist, die lediglich eine leichte Abweichung von der Expression der Kontrollen zeigt, liegt bei dem Indexpatienten eine stark erhöhte Expression des *KCNQ1*-Gens vor.

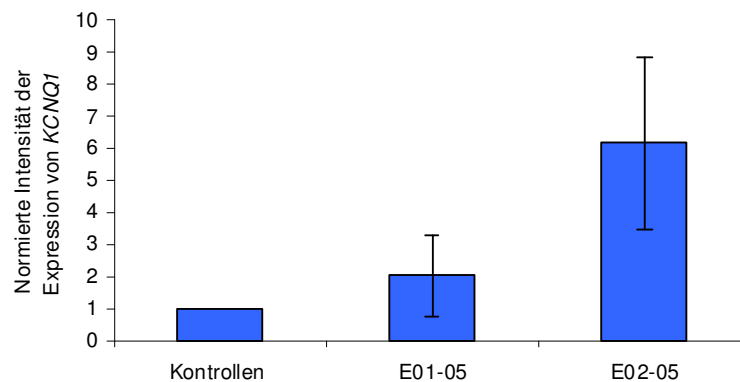


Abb. 4.6: Expression von KCNQ1 in Lymphozyten des Patienten FN (E02-05) und seiner Mutter (E01-05). Normiert dargestellt ist das Verhältnis der Expression im Vergleich zu der Expression von gesunden Kontrollpersonen (Kontrollen, n=3).

4.3 Untersuchung des Spliceverhaltens varianter Sequenzen des Gens *H19*

In einer vorangegangenen Studie (Schönherr, 2005) erfolgte ein Mutationsscreening von *H19* bei 44 SRS-Patienten. Hierbei konnten variante Sequenzen bei drei Patienten nachgewiesen werden. Bei den Patienten SR17K und SR81K handelt es sich um zwei unterschiedliche 3 bp-Deletionen innerhalb von Exon 1 (SR17K: g.8618_8620delGGG; SR81K: g.8822_8824delAGG). Die Patientin SR93K weist eine 39 bp-Duplikation im Übergang von Exon 2 zu Intron 2 auf (g.9867_9905dup39). Hierbei liegen die letzten 15 bp des Exon 2 und die ersten 24 bp des Intron 2 dupliziert vor. Während eine Untersuchung elterlichen Materials aufgrund fehlender DNA bei SR81K nicht möglich war, konnte die Mutation bei SR17K beim Vater ausgeschlossen werden, allerdings stand keine mütterliche DNA zum Nachweis der Mutation zur Verfügung. Bei SR93K erfolgte die Vererbung der Mutation über den Vater. Zusätzlich weist diese Patientin eine Hypomethylierung der ICR1 auf. Die detektierten Veränderungen waren weder in der Datenbank beschrieben noch konnten sie in 100 gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. Um nun die funktionelle Relevanz dieser Veränderungen für die Funktion der untranslatierten RNA *H19* und die mögliche Rolle für die Ätiologie des SRS einschätzen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit Splicinganalysen der varianten Sequenzen durchgeführt.

4.3.1 Splicinganalysen der varianten *H19*-Sequenzen durch Transfektion in HEK293 und Cos7

Da, außer für die Patientin SR93K, kein Material der Patienten zur Isolation von RNA vorlag, wurden Konstrukte für alle drei Varianten sowie für die Wildtyp *H19*-Sequenz in eukaryotischen Expressionsvektoren erzeugt (s. 3.2.5.2). Diese wurden dann in eukaryotische Zellkulturen (HEK293 und Cos7) transfiziert (s. 3.2.7), sodass eine Expression der varianten Sequenzen in diesen Zellen stattfinden konnte. Die transkribierte RNA wurde isoliert (s. 3.2.8) und auf ein verändertes Spliceverhalten im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz untersucht. Hierzu wurde nach einer reversen Transkription der RNA in cDNA (s. 3.2.9) eine PCR mit Primern durchgeführt, die innerhalb des ersten und letzten Exons des Gens lokalisiert waren (H19-1.7F/2 und H19-TaqR) (s. Tab. 6.9 in 6. Anhang). Man erzielte somit eine Amplifikation der annähernd kompletten cDNA-Sequenz. Nach der Auftrennung der Fragmente auf einem 0,7%igem Agarosegel konnten die Bandenmuster sowohl der varianten und als auch der Wildtyp-Sequenzen miteinander verglichen werden (s. Abb. 4.7 a). Es konnten hierbei jeweils drei Banden in allen Wildtyp- und Varianten-Konstrukten nachgewiesen werden, die teilweise unterschiedliche Intensitäten aufwiesen.

SR17K und SR81K

Eine direkte Sequenzierung der Banden nach Gelextraktion im Fall der Konstrukte zu SR17K und SR81K ergab (s. Tab. 4.7 b), dass die Bande 1 aus zwei Fragmenten besteht. Durch Subklonierung der Fragmente in TOPO TA-Vektoren (s. 3.2.5.1) und anschließender Sequenzierung einzelner Klone konnte die Bande 1 in die beiden Banden 1.1 (1979 bp) und 1.2 (1856 bp) unterteilt werden, die sich aufgrund ihres geringen Längenunterschieds im Agarosegel nicht auftrennen ließen. Bande 1.1 enthielt ein Fragment mit der kompletten cDNA-Sequenz aller Exone (full-length). Das Fragment 1.2 wies eine Deletion von Exon 4 auf. Die zweite Bande mit 961 bp zeigte einen partiellen Verlust des Exons 1 und Bande 3 (~800 bp) bestand wiederum aus drei unterschiedlichen Transkripten (3.1, 3.2 und 3.3) die alle einen Verlust des Exons 4 sowie einen partiellen Verlust des Exons 1 aufwiesen, der jedoch bei den verschiedenen Fragmenten in seinen Bruchpunkten variierte (s. Tab. 4.4).

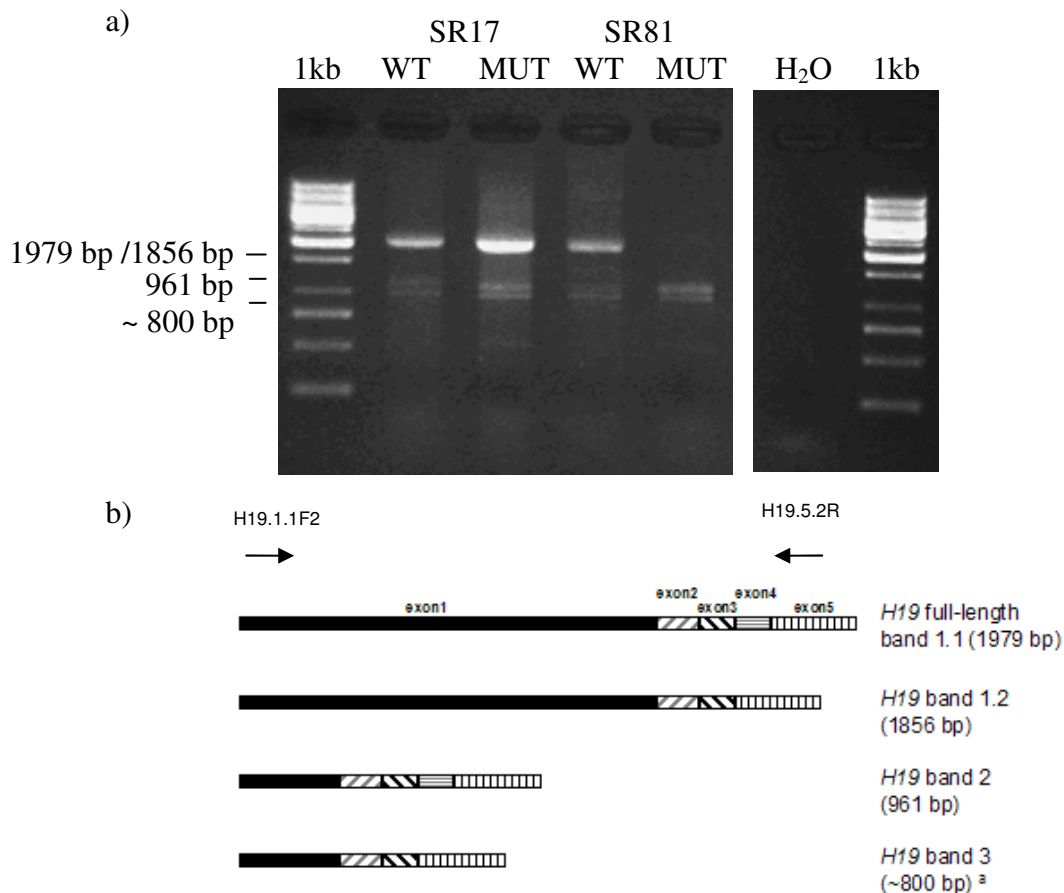


Abb. 4.7: *H19*-Splicevarianten aus HEK293-Zelllinien nach Transfektion mit den Konstrukten der varianten und wildtyp *H19*-Sequenz von SR17K und SR81K a) auf einem 0.7% Agarosegel b) in einer schematischen Abbildung (Pfeile: Position der Primer H19.1.1F2-H19.5.2R). Bande 3 beinhaltet die Transkripte 3.1, 3.2 and 3.3 wie in Tabelle 4.4 dargestellt. (Abbildung aus Schönherr et al., 2008)

Die nachgewiesenen Transkripte wurden mit Angaben zu bereits veröffentlichten Splicevarianten von *H19* mit der NCBI- und Aceview-Datenbank verglichen (s. 3.2.14). Hierbei wurde für das Transkript 1.2 mit der Länge von 1856 bp der Klon CR596119 aus menschlicher plazentarer cDNA identifiziert. Die Bruchpunkte des Fragments 3.3 entsprechen genau dem Klon BE018759 aus menschlicher cDNA, jedoch besitzt dieser Klon im Gegensatz zu Fragment 3.3 das Exon 4. Trotz einer großen Anzahl beschriebener *H19*-Transkript-Klone konnte kein weiteres Transkript mit 100%iger Übereinstimmung identifiziert werden.

Bei der Untersuchung des Splicings der varianten Sequenz von *H19* im Falle von SR17K (g.8618_8620delGGG) konnten bei den durchgeführten Analysen keine Veränderungen im Vergleich zu der Wildtyp-Sequenz nachgewiesen werden.

Tab. 4.4: Splicevarianten von *H19* aus HEK293 nach Transfektion mit den verschiedenen *H19*-Konstrukten von SR17K und SR81K (*, #, °, +: Transkripte mit unterschiedlichen Bruchpunkten, die Nukleotid-Nummerierung entspricht den Angaben in Klon AF087017 der NCBI-Datenbank).

Bande (bp)	Zusammensetzung	Bruchpunkte
1.1 (1979)	full-length Exons 1-2-3-4-5	-
1.2 (1856)	Exons 1-2-3-5	g.10089 – g.10373 (Exon 3- Exon 5)
2 (961)	Exons 1*-2-3-4-5	g.8746 – g.9746 (Exon 1- Exon 2)
3.1 (862)	Exons 1 [#] -2-3-5	g.8770 – g.9746 (Exon 1- Exon 2) g.10089 – g.10373 (Exon 3- Exon 5)
3.2 (838)	Exons 1*-2-3-5	g.8746 – g.9746 (Exon 1- Exon 2) g.10089 – g.10373 (Exon 3- Exon 5)
3.3 (792)	Exons 1 [°] -2 ⁺ -3-5	g.8668 – g.9783 (Exon 1 - Exon 2) g.10089 – g.10373 (Exon 3- Exon 5)

Im Fall von SR81K (g.8822_8824delAGG) konnten bei Verwendung der varianten Sequenz die gleichen Transkripte nachgewiesen werden wie bei der Wildtyp-Sequenz, allerdings lag hierbei eine starke Verschiebung der Expressionsintensität der verschiedenen Transkripte im Vergleich zu der Wildtyp-Sequenz vor. Während beim Wildtyp die Fragmente 1.1 und 1.2 am stärksten exprimiert wurden, liegt im Fall der Variante eine verstärkte Expression der kleineren Fragmente 2 und 3 vor. Bei Messung der Intensität der Transkripte mit Hilfe des GelDoc2000 Imaging System und der Quantity one Version 4-Software (BioRad) konnte eine deutliche Verschiebung des Splicingmusters nachgewiesen werden (s. Abb.4.8).

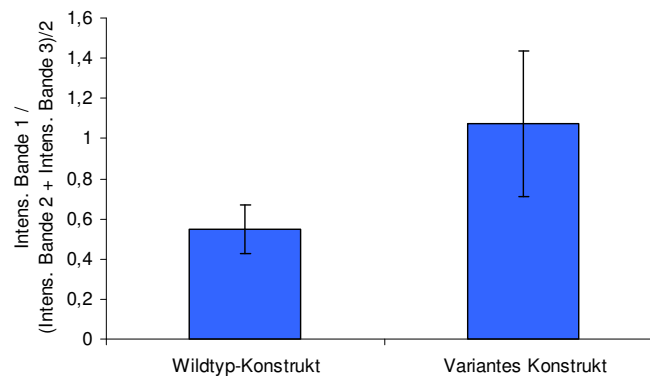


Abb. 4.8: Darstellung der verschobenen Intensität der verschiedenen Splicing-Transkripte bei SR81K des Wildtyp- und des Varianten-Konstrukts. Auf der y-Achse dargestellt ist die Intensität der Bande 1 dividiert durch den Mittelwert der Intensitäten von Bande 2 und Bande 3. Die Daten basieren auf zwei unabhängigen Transfektionen und sechs unabhängigen PCR-Amplifikationen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

Um zu untersuchen, ob es sich bei der detektierten Variante bei SR81K (8822_8824delAGG) um eine Mutation handelt, die eine ESE-Stelle (s. 3.2.15) betrifft und aus diesem Grund ein verstärktes Splicing innerhalb von Exon 1 stattfindet, wurde die Wahrscheinlichkeit einer ESE-Stelle mit der entsprechenden Software ermittelt (s. 3.2.15). Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Wildtyp-Sequenz AGGAGGT ein Bindemotiv für den Enhancer *SF2/ASF* darstellt und einen Wahrscheinlichkeitswert von 2.433 erreicht (Durchschnitt für *SF2/ASF* ist 1.956). Da allerdings diese Stelle in der mutierten Form verloren geht, erklärt dies nicht das erhöhte Spliceverhalten zu Gunsten der kleineren Transkripte.

SR93K

Während der Analyse der Transkripte aus HEK293-Zellen nach Transfektion mit der varianten Sequenz von SR93K (g.9867_9905dup39) konnte neben den oben beschriebenen, eine zusätzliche Splicevariante identifiziert werden. Da die Duplikation von SR93K auf genomischer Ebene die Exon 2/Intron 2-Splice Stelle beinhaltet und diese somit doppelt vorliegt, ist dies vermutlich die Ursache für das zusätzliche Transkript.

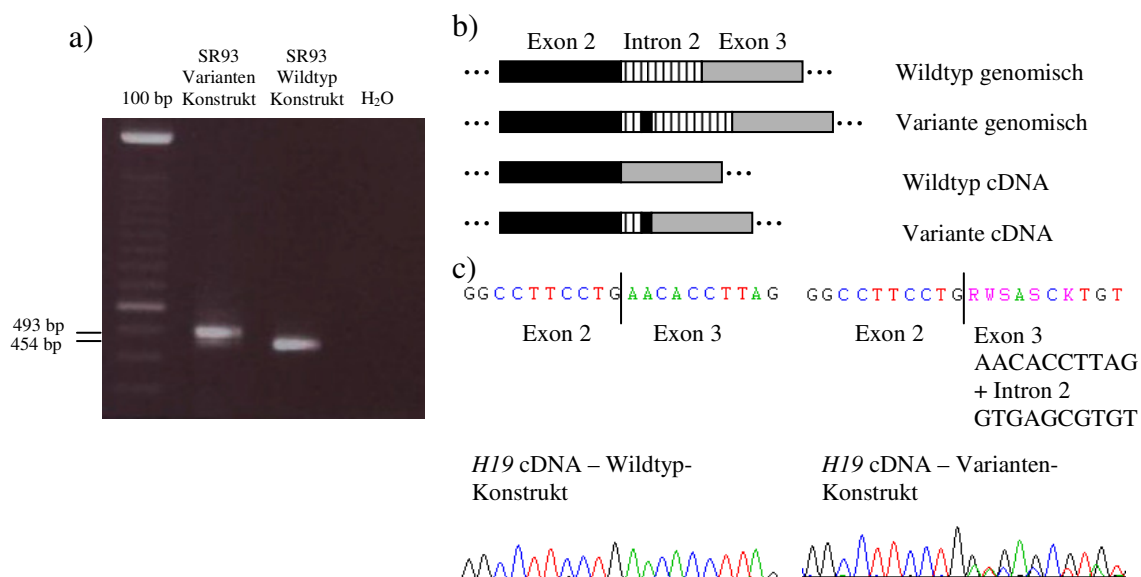


Abb. 4.9: Darstellung der Splice-Variante mit Exon 2/Intron 2-Übergang von *H19* bei SR93K. a) PCR an cDNA von HEK293-Zellen nach Transfektion mit dem Wildtyp- bzw. Varianten-Konstrukt mit den Primern H19-1.7F/2-H19-TaqR. b) Illustration der *H19*-cDNA Fragmente und genomischen Sequenzen bei SR93K. c) Direkte Sequenzierung des Exon 2/Intron 2 Übergangs der beiden Transkripte aus Abb. 4.9 a. (Abbildung aus Schönherr et al., 2008)

Um eine genauere Charakterisierung dieses Fragments ermöglichen zu können wurde eine PCR der cDNA des Varianten-Konstrukts mit Primern durchgeführt (H19-1.7F/2-H19-TaqR),

die näher an der Duplikation lokalisiert sind und somit ein kleineres Produkt erzeugen. Hierbei konnten zwei Transkripte detektiert werden: zum einen das Wildtyp-Transkript mit normalem Exon 2 zu Exon 3-Übergang und ein Transkript mit Duplikation der letzten 15 bp von Exon 2 und Insertion von 24 bp des Introns 2 (s. Abb. 4.9 b und 4.9 c). Es konnte eine weitaus stärkere Intensität des varianten Allels festgestellt werden (s. Abb. 4.9 a). Dies lässt vermuten, dass bei Nutzung beider Splice Stellen auf dem mutierten Allel eine Bevorzugung der varianten Form vorliegt. Eine Wiederholung aller Transfektionsversuche mit Cos7-Zelllinien bestätigte die Befunde in allen verwendeten Konstrukten.

4.3.2 Untersuchung der monoallelischen Expression von *H19* bei SR93K

Um ausschließen zu können, dass die Duplikation bei SR93K einen Einfluss auf die monoallelische Expression von *H19* hat, wurde bei SR93K und ihren Eltern RNA aus Lymphozyten des Blutes isoliert. Bei Untersuchungen der genomischen DNA der Großeltern von SR93K konnte die Mutation bei der väterlichen Großmutter nachgewiesen werden.

Bei Verwendung der 39 bp-Duplikation als Marker für die beiden elterlichen Allele wurde eine PCR an cDNA durchgeführt, die die Duplikation mit einschließt (H19-1.7F2/H19-TaqR s. Abb. 4.10).

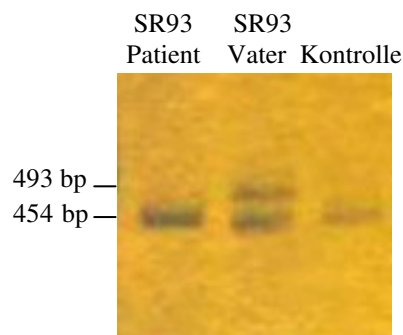


Abb. 4.10: Expressions-Analyse von *H19* mit cDNA von SR93K und ihrem Vater. Als informativer Marker wurde die 39 bp-Duplikation verwendet. Das Produkt mit 493 bp stellt das Fragment mit Duplikation und das Produkt mit 454 bp das Wildtyp-Allel dar.

Das Produkt wurde mit Hilfe der Fragment-Analyse mittels Silberfärbung detektiert (s. 3.2.3.1). Bei der Patientin SR93K konnte lediglich eine normale monoallelische Expression des maternalen Wildtyp-Allels nachgewiesen werden (s. Abb. 4.10). Der Vater hingegen wies eine Expression sowohl des Wildtyp- als auch des Varianten-Transkripts auf. Dies lässt sich vermutlich durch die Realisierung beider Transkripte vom maternalen Allel,

bedingt durch die variante Splice Stelle, erklären, da bei ihm die Mutation maternal vererbt wurde.

4.4 Untersuchung von (epi)genetischen Veränderungen auf Chromosom 7 bei SRS-Patienten

Wie bereits beschrieben können in ca. 7-10% der SRS-Patienten Duplikationen oder UPDs für das Chromosom 7 (s. 2.2.2.1) nachgewiesen werden. Zur genaueren Frequenzbestimmung auch dieser Veränderungen in unserem Kollektiv aus 72 SRS-Patienten und 188 Patienten der Routinediagnostik mit SRS-Merkmalen wurden MS-PCRs (3.2.4.2.1) und Mikrosatelliten-Analysen (3.2.4.1) durchgeführt. Hierbei konnte eine UPD(7)mat bei neun der 72 (12,5%) SRS- und fünf der 188 (2,3%) Routine-Diagnostik Patienten detektiert werden.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden weitere Beobachtungen zur Charakterisierung chromosomaler Veränderungen der beiden Kandidatenregionen 7p12.1-p13 und 7q32 getroffen.

4.4.1 Nachweis segmentaler UPDs(7) mat

In der Literatur sind zwei SRS-Patienten beschrieben (s. 2.2.2.1), die keine vollständige, sondern eine segmentale UPD(7)mat aufweisen (Hannula et al., 2001; Reboul et al., 2006). Nach Anwendung der MS-PCR für das Chromosom 7 bei unserem Kollektiv aus typischen SRS- und Routine-Diagnostik-Patienten wurden daher bei den Patienten mit positivem UPD(7)mat Befund zusätzlich Mikrosatelliten-Analysen durchgeführt. Dies ist notwendig, da sich die Analyse des Methylierungsindex bei der MS-PCR auf die chromosomale Region 7q32 beschränkt und nicht zwischen segmentalen und vollständigen UPDs unterscheiden kann.

Die verwendeten Mikrosatelliten sind über das komplette Chromosom 7 verteilt (s. Tab. 6.3 in 6. Anhang). Bei einem der fünf UPD(7)mat positiven Patienten der Routine-Diagnostik (M3335) sowie einem der neun Positiven des SRS-Kollektiv (SR85K) konnte der positive MS-PCR-Befund lediglich für einen Teil der Marker bestätigt und somit eine segmentale UPD(7)mat nachgewiesen werden (s. Tab. 6.4 und 6.5 in 6. Anhang).

In beiden Fällen handelt es sich um eine segmentale UPD(7)mat ausgehend von der Bande 7q11.2 bis zum terminalen Ende von Chromosom 7q (7q11.2-qter) (Eggermann et al., 2008d).

Diese Bereiche schließen die Region mit ein, die bei bisher beschriebenen Fällen einer segmentalen UPD(7)mat immer betroffen waren (s. Abb. 4.11).

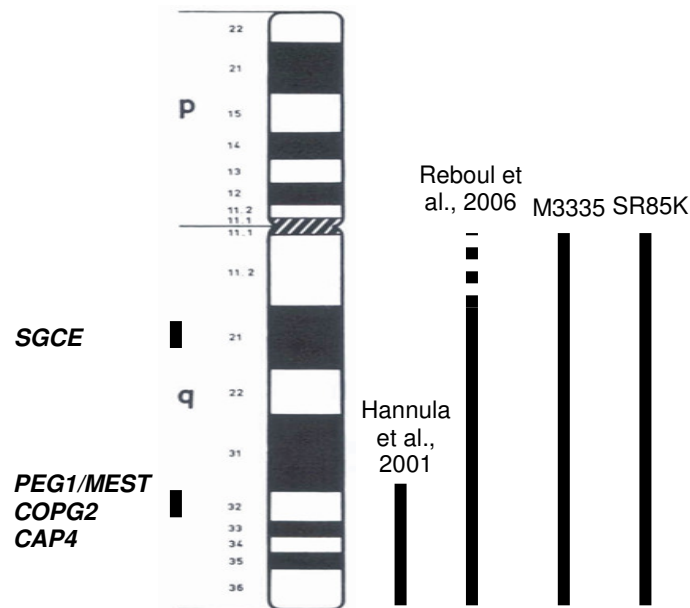


Abb. 4.11: Darstellung der bisher beschriebenen und in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen segmentalen UPDs(7)mat bei SRS-Patienten.

Bei dem Patienten M3335 liegt der Bruchpunkt der UPD zwischen den beiden Markern D7S2422 (51,1 Mbp von pter) und D7S2429 (62,2 Mbp von pter) und bei SR85K zwischen D7S2429 (62,2 Mbp von pter) und D7S663 (66,4 Mbp von pter).

4.4.2 Ausschluss isolierter Methylierungsdefekte innerhalb von 7q32

Nachdem bei Erkrankungen wie dem „Maternalen UPD14 Syndrom“, die ebenso wie das SRS mit UPDs einer bestimmten elterlich geprägten Region assoziiert sind, isolierte Methylierungsdefekte dieser Regionen beschrieben wurden (Temple et al., 2007), sollte in der vorliegenden Arbeit ein Nachweis ähnlicher Defekte beim SRS vorgenommen werden. Für das SRS wurden, wie bereits in 4.4.1 beschrieben, neben vollständigen auch segmentale UPDs des Chromosom 7 detektiert, die bisher in allen Fällen die geprägte Kandidatenregion 7q32 beinhaltet. Somit wäre es denkbar, dass für diese Region, die u.a. der Regulation des wachstumsrelevanten Gens *PEG1/MEST* dient, isolierte Methylierungsdefekte vorliegen. Da in 7q32 das maternale Allel methyliert vorliegt hätte eine Hypermethylierung dieser Region vergleichbare Auswirkungen wie eine UPD(7)mat.

In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund eine MS-PCR für 7q32 bei 54 SRS-Patienten ohne Hypomethylierung in 11p15 durchgeführt. Da bei einer MS-PCR keine

Unterscheidung zwischen einer UPD und einem Methylierungsdefekt möglich ist, wurden bei einem positiven MS-PCR-Befund Mikrosatelliten-Analysen mit Markern vorgenommen, die sehr nah an der Region 7q32 lokalisiert sind. Bei positiven Mikrosatelliten-Ergebnissen könnte ein isolierter Methylierungsdefekt ausgeschlossen werden, da mit Hilfe dieses Verfahrens lediglich UPDs detektiert werden können.

Bei keinem der analysierten Patienten konnte eine isolierte Hypermethylierung in 7q32 nachgewiesen werden (Schönherr et al., 2008).

4.5 Nachweis interchromosomaler Interaktionen der Chromosomen 11 und 7

Da mit dem SRS elterlich geprägte Regionen unterschiedlicher Chromosomen assoziiert sind, stellt sich die Frage nach einer funktionellen Verbindung dieser verantwortlichen Loci. Kürzlich wiesen Ling et al. (2006) interchromosomale Interaktionen spezifischer Regionen der Maus-Chromosomen 7 und 11 nach. Denkbar wäre auch die Regulation aller assoziierten Regionen durch denselben Faktor. Um auch im Fall des SRS mögliche Interaktionen der elterlich geprägten Region 11p15 mit 7q32 und/oder 7p12-p11.2 oder gemeinsame regulative Funktionen detektieren zu können, wurden unterschiedliche Verfahren durchgeführt.

4.5.1 Zwei-Farben-FISH an plazentaren Interphase-Kernen

Um eine räumliche Assoziation der chromosomalen Region 11p15 (*H19*) zu den beiden Regionen auf Chromosom 7 nachweisen zu können, wurden Zwei-Farben-FISH-Analysen durchgeführt (3.2.11.1) bei denen jeweils zwei unterschiedlich markierte Sonden eingesetzt wurden. In jedem Ansatz wurde jeweils eine Sonde verwendet, die gegen 11p15 gerichtet war und zusätzlich eine gegen 7q32 (*PEG1/MEST*) oder 7p12-p11.2 (*GRB10*). Zur Bestätigung einer Kolo-kalisation sollten die Sonden innerhalb eines Interphase-Kerns möglichst nah beieinander lokalisiert sein oder, bei einem sehr geringen Abstand zueinander, sogar ein Mischsignal erzeugen. Als Zellsystem wurde plazentares Gewebe verwendet, da in der vorliegenden Arbeit die zellulären Prozesse während der embryonalen Wachstums- und Entwicklungsphase eine vordergründige Rolle spielen.

Die Interphase-Kerne wurden während der Auswertung am Mikroskop keiner Vorauswahl unterzogen. Es erfolgte eine Analyse der Kerne in allen Ebenen durch Aufnahme und Interpretation eines Z-Stapels. Aufgrund einer schlechten Visualisierung und Auflösung der

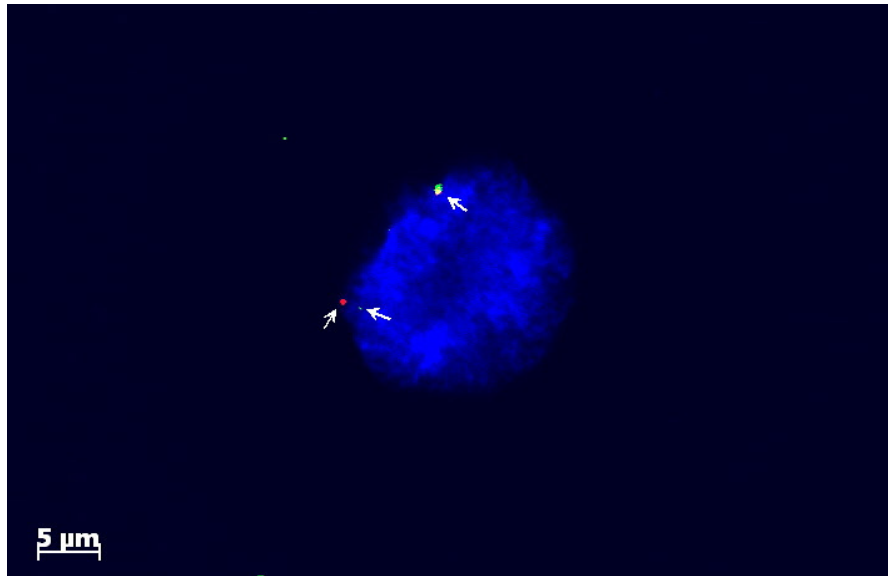
obersten und untersten Schichten des Kerns konnten diese Bereiche nicht interpretiert werden. Es erfolgten insgesamt drei unabhängige Markierungen der Sonden für *H19* und *GRB10* und zwei für *H19* und *PEG1/MEST*. Hierbei wurden die beiden unterschiedlichen Markierungen für die verschiedenen Sonden untereinander ausgewechselt, um einen Einfluss immer gleich markierter Sonden auf das Resultat der FISH ausschließen zu können.

Während der Interpretation der aufgenommenen Z-Stapel der verschiedenen Kerne ergab sich das Problem, dass die Signale der einzelnen Sonden sehr schwach waren und somit in den meisten Aufnahmen keine Detektion aller vier Signale möglich war (jeweils zwei für die homologen Chromosomen). Des Weiteren war durch die fehlenden obersten und untersten Schichten jedes Z-Stapels ein gewisser Anteil der Kerne nicht beurteilbar. Da die Signale innerhalb der Kerne bei einer 63x Vergrößerung nur durch die starke Auflösung der Kamera und nicht alleine mit dem Auge am Mikroskop sichtbar waren, mussten die Aufnahmen des Z-Stapels nach einem Zufallsprinzip erfolgen. Es wurden fünf unabhängige FISH-Analysen in der Kombination *H19* / *GRB10* und zwei mit *H19* / *PEG1/MEST* durchgeführt.

Für *H19* / *GRB10* konnte bei insgesamt 106 Aufnahmen in sechs Fällen eine Kolokalisation, jeweils einer *H19*- und einer *GRB10*-Sonde, detektiert werden. In vier dieser sechs Fälle war zusätzlich ein Nachweis der beiden restlichen Signale, die räumlich getrennt voneinander lokalisiert waren, innerhalb desselben Kerns möglich (s. Abb. 4.12 a). In keiner der Aufnahmen war es möglich alle vier Signale räumlich getrennt voneinander nachzuweisen. Aufgrund der Detektion von lediglich zwei bis drei Signalen in den restlichen 100 Kernen kann dort eine Kolokalisation weder ausgeschlossen noch bestätigt werden (s. Tab. 4.5).

Für *H19* / *PEG1/MEST* erfolgten insgesamt 37 Aufnahmen. In zwei dieser 37 Aufnahmen konnten alle vier Sonden dargestellt werden. Bei einem dieser Fälle war eine Kolokalisation jeweils einer Sonde der beiden Loci darstellbar, wobei die beiden restlichen Sonden getrennt voneinander lokalisiert waren. Der zweite Kern zeigte sogar zwei Interaktionen von jeweils zwei Sonden der unterschiedlichen Loci (s. Abb. 4.12 b). In zwei weiteren Kernen war eine Interaktion jeweils einer der beiden unterschiedlichen Sonden detektierbar, wobei jedoch die anderen beiden Signale nicht nachzuweisen waren (s. Tab. 4.5).

a)



b)

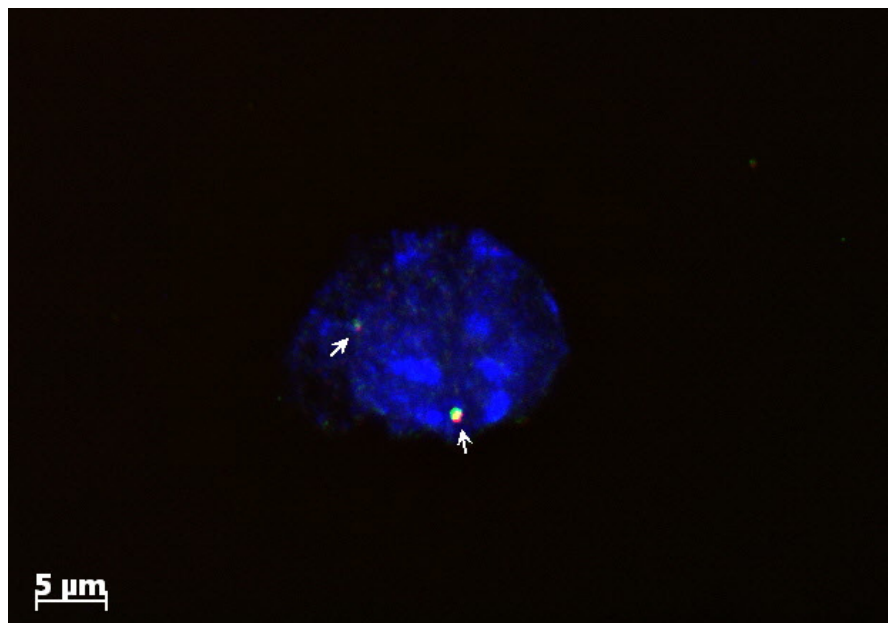


Abb. 4.12: Zwei-Farben-FISH an plazentaren Interphase-Kernen. Eine gelbe Färbung deutet auf eine Kolokalisation der beiden Sonden hin. a) Verwendete Sonden: *GRB10* (rot) und *H19* (grün). b) Verwendete Sonden: *PEG1/MEST* (grün) und *H19* (rot).

Die Durchführung der gleichen Analyse mit Lymphozyten-Präparaten und den Sonden für *H19* / *GRB10* erbrachte bei 12 Aufnahmen eine Detektion von drei Kernen bei denen alle vier Signale sichtbar waren. In zwei dieser vier Fälle lag eine Kolokalisation jeweils eines Signals, sowie eine getrennte Lokalisation der beiden restlichen Signale vor. In einem Kern konnten erstmals alle vier Signale getrennt voneinander nachgewiesen werden. Für die Kombination der Sonden *H19* / *PEG1/MEST* konnte in fünf Kernen weder eine Kolokalisation beobachtet

werden, noch konnten in einem dieser Kerne alle vier Signale gleichzeitig detektiert werden (s. Tab 4.5).

Tab. 4.5: Anzahl der beobachteten Signale und Interaktionen in den analysierten Kerne während der FISH-Analyse

Zellkultur / Sonden- Kombination	Aufgenommene Kerne insgesamt	Kerne mit allen vier Signalen	Kerne mit Kolokalisation jeweils einer der beiden Sonden / mit zwei Kolokalisationen jeweils einer Sonde	Detektierte Kerne mit vier räumlich voneinander getrennten Signalen
Trophoblasten- Zellkultur <i>H19 / GRB10</i>	106	4	6/0	0
Trophoblasten- Zellkultur <i>H19 / PEG1/MEST</i>	37	2	3/1	0
Lymphozyten- Präparate <i>H19 / GRB10</i>	12	3	2/0	1
Lymphozyten- Präparate <i>H19 / PEG1/MEST</i>	5	0	0/0	0

4.5.2 Associated Chromosome Trap Assay (ACT)

Zum Nachweis einer Interaktion chromosomalen Materials der *H19*-DMR in 11p15 mit der maternal methylierten Region des Gens *GRB10* in 7p12-p11.2 und/oder der maternal methylierten Promotor-Region des Gens *PEG1/MEST* in 7q32 wurde der ACT-Assay verwendet (s. 3.2.12).

Bei einer Interaktion dieser chromosomalen Regionen würde man erwarten, dass man bei einer abschließenden PCR Produkte erhalten würde, die jeweils zu einem Teil aus einem Fragment der beiden interagierenden Regionen besteht.

Bei der Verwendung aller drei Enzyme und aller möglichen Primer-Kombinationen (Tab. 3.11) wurden PCR-Produkte erzeugt, die dann allerdings bei einer anschließenden Sequenzierung und Vergleich der Sequenzen mit der Datenbank (3.2.14) unspezifischen PCR-Artefakten zugeordnet werden konnten.

Mit Hilfe des ACT-Assays konnte demnach bisher weder eine Interaktion der Region um *H19* mit dem *GRB10*- noch mit dem *PEG1/MEST*-Locus nachgewiesen werden.

4.5.3 Quantitative Expressionsanalyse nach Transfektion plazentarer Zellkulturen mit *CTCF*-Konstrukten

Bei *CTCF* handelt es sich um ein hoch konserviertes Protein, das als Regulator der Expression und des Imprintings diverser Gene dient und verschiedene DNA-Sequenzen mit Hilfe seiner elf Zink-Finger-Domänen binden kann.

Es ist beteiligt an der Regulation des Imprintings von *H19* und *IGF2* in 11p15. Um nachzuweisen, ob dieses Protein auch an der Regulation der geprägten Regionen in 7p12-p11.2 und/oder 7q32 beteiligt ist und somit als verbindender Faktor zwischen den unterschiedlichen mit dem SRS assoziierten chromosomalen Veränderungen dient, wurden quantitative Real-Time Analysen durchgeführt, die die Expression der Gene *PEG1/MEST* und *GRB10* nach Transfektion und somit Überexpression von *CTCF* in Zellkultur bestimmen sollten (s. 3.2.10.2).

Drei Trophoblasten-Zellkulturen unterschiedlicher Plazenten wurden kultiviert, die unabhängig voneinander transfiziert wurden. Insgesamt wurden von diesen drei Zellkulturen zehn quantitative Analysen der Expression der relevanten Gene durchgeführt.

Es erfolgte eine Normierung der Expressionsintensität der analysierten Gene in den Zellen, die mit dem *CTCF*-Konstrukt transfiziert wurden, mit der Intensität derselben Gene in den untransfizierten Zellen.

Eine Bestätigung dafür, dass die Transfektion der Zellen mit dem *CTCF*-Konstrukt und eine anschließende Expression stattgefunden hat, konnte durch eine deutliche Erhöhung der *CTCF*-Expression bei den transfizierten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Wildtyp-Zellen um einen normierten Faktor von 48,98 dargestellt werden (s. Abb. 4.13).

Bei dem Zielgen *GRB10* konnte eine leichte Erhöhung der Expression um den Faktor 1,26 nachgewiesen werden. Allerdings wurde eine gleichwertige Erhöhung der Expression (1,27) für das Referenzgen *TBP* festgestellt, sodass es sich hierbei lediglich um einen unspezifischen Effekt handelt, der nicht auf die erhöhte Konzentration von *CTCF* zurückzuführen ist.

Als Positiv-Kontrolle wurde die Expression des Gens *MYC* analysiert, das einer negativen Regulation durch *CTCF* unterliegt. Hier bestätigte sich die Wirkung der *CTCF*-Transfektion durch eine deutliche Abnahme der *MYC*-Expression um einen normierten Faktor von 0,89.

Für *PEG1/MEST* konnte sogar eine wesentlich stärkere Erniedrigung der Expression nach Transfektion mit *CTCF* um einen normierten Faktor von 0,41 nachgewiesen werden.

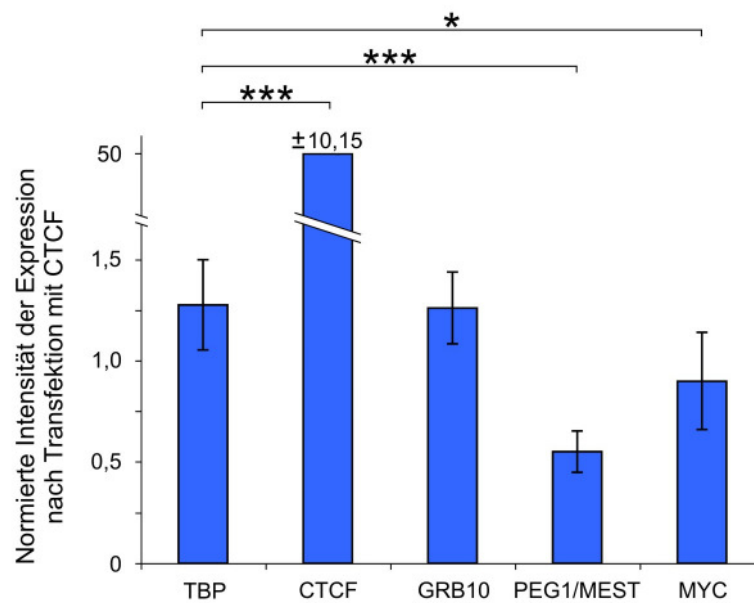


Abb. 4.13: Dargestellt ist die normierte Expressions-Intensität (Mittelwerte mit Standardabweichung) der Gene *TBP*, *CTCF*, *GRB10*, *PEG1/MEST* und *MYC* in Trophoblasten-Zellkulturen nach Transfektion mit einem CTCF-Konstrukt. Die Normierung erfolgte gegen die Expressions-Intensität in untransfizierten Zellen. Es liegt ein statistisch signifikanter Unterschied der Mittelwerte der normierten Expressionsintensität von *CTCF*, *PEG1/MEST* und *MYC* zu dem des Kontrollgens *TBP* vor (*: $p \leq 0,05$; ***: $p < 0,0001$).

Da für das Referenzgen *TBP* eine Erhöhung der Expression vorliegt, die auf unspezifische Effekte zurückzuführen ist, da keine Beeinflussung dieses Haushaltgens durch *CTCF* zu vermuten ist, kann man davon ausgehen, dass bei Herausrechnen dieser unspezifischen Faktoren sogar eine deutlichere Erniedrigung der Expression von *PEG1/MEST* und *MYC* vorliegt. Normiert man die Expression von *PEG1/MEST* und *MYC* gegen die des Referenzgens *TBP*, so kann eine Erniedrigung der Expression dieser beiden Gene um einen Faktor von 0,45 und 0,67 nachgewiesen werden.

4.6 Etablierung der 500K SNP-Microarray-Technologie

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Etablierung der 500K SNP-Microarray-Technologie unter Verwendung von vier genomischen DNAs. Dabei handelte es sich um eine gesunde Kontrollperson, einen SRS-Patienten (FN) mit bekannter Duplikation in 11p15 sowie zwei SRS-Patienten bei denen in den vorangegangenen Untersuchungen keine der für das SRS bekannten (Epi)mutationen nachgewiesen werden konnte.

Während bei der gesunden Kontrollperson und einem der SRS-Patienten keine besonderen Auffälligkeiten der Kopienzahl innerhalb des Genoms nachgewiesen werden konnten, bestätigte sich die bekannte Aberration bei dem Patienten FN.

Bei dem SRS-Patienten SR12K konnte eine Duplikation der chromosomalen Region 21q22.11-q22.12 von ca. 0,5 Mbp dargestellt werden (Entfernung von pter: 34,42-34,93 Mbp) (s. Abb. 4.14).

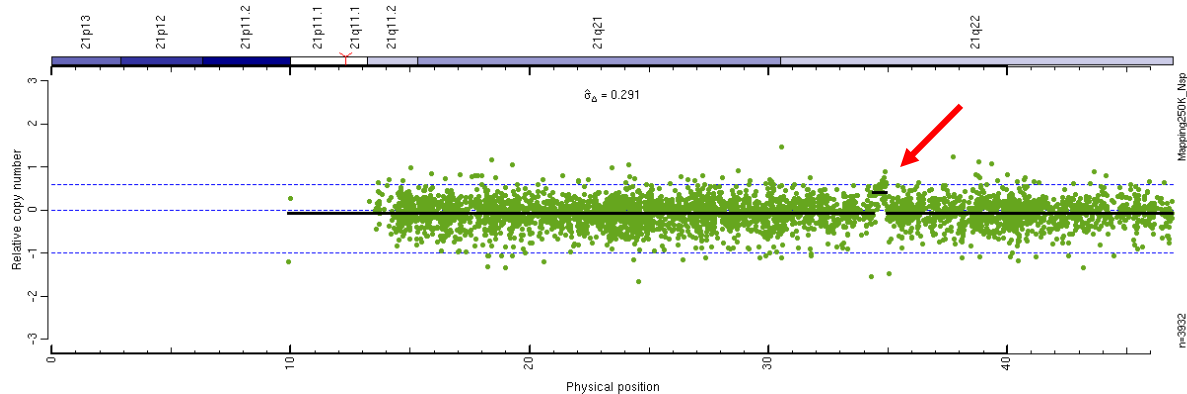


Abb. 4.14: Darstellung der Microarray-Ergebnisse für SR12K auf Chromosom 21. Die Werte der einzelnen Marker sind als grüne Punkte dargestellt. Der Pfeil verweist auf die SNP-Marker, die eine Erhöhung der Kopienzahl anzeigen.

Nach Datenbankrecherchen wurde innerhalb der duplizierten Region jedoch ein in der Literatur beschriebener Kopienzahl-Polymorphismus (CNV) detektiert. Hierbei handelt es sich um den Polymorphismus 34534 (UCSC), der lokalisiert ist in 21q22.11 - 21q22.12 (Entfernung von pter: 34,64-34,82 Mbp). Des Weiteren ist innerhalb der duplizierten Region das Gen *KCNE1* (OMIM *176261) lokalisiert (Entfernung von pter: 34,74-34,80 Mbp), welches neben *KCNQ1* in 11p15 für die zweite Untereinheit des kardialen I(Ks) (slowly activating cardiac delayed rectifier) Kanals kodiert. Die kodierende Sequenz für dieses Gen befindet sich allerdings komplett innerhalb des bekannten Kopienzahl-Polymorphismus.

Nach den ermittelten Daten des Microarrays liegt bei dem Patienten SR12K eine Duplikation vor, die den beschriebenen Polymorphismus überspannt. Vermutlich handelt es sich hierbei jedoch um Ungenauigkeiten der Microarray-Daten. Diese ungenaue Bruchpunktbestimmung ist ein bekanntes Problem des verwendeten 500K-Microarrays.

Microarray-Analysen bei den Eltern des Patienten SR12K bestätigten eine Duplikation mit den gleichen Ausmaßen bei seinem Vater. Die Mutter zeigte unauffällige Ergebnisse.

4.6.1 Bestätigung der Duplikation mit Hilfe von Mikrosatelliten-Analysen

Mikrosatelliten-Analysen (s. 3.2.4.1) bei dem Patienten SR12K und seinen Eltern bestätigten die Duplikation bei SR12K und seinem Vater (s. Tab. 4.6).

Tab. 4.6: Verwendete Mikrosatelliten-Marker und ihre Informativität zur Duplikationsanalyse bei Familie SR21. Die Zahlenwerte in den Spalten der verschiedenen Familienmitglieder gibt Auskunft über die Länge (bp) der Allelzustände der jeweiligen Mikrosatelliten-Marker.

Marker (Entfernung von 21pter in Mbp)	SR12 Vater	SR12 Mutter	SR12 Kind
21-3455 (34,55)	228	228-234	228-228-234
21-3456 (34,56)	303	303-311	303-303-311
21-3461 (34,61)	238	230-236	230-238-238
21-3470 (34,70)	158-160-160	158-168	158-158-160

Aufgrund einer geringen Anzahl beschriebener Marker in dieser Region konnte keine genaue Eingrenzung der Duplikation mit diesem Verfahren erfolgen. Bei einem Screening von 14 weiteren gut charakterisierten SRS-Patienten, ohne (Epi)mutationen auf Chromosom 11 oder 7, wurde keine Duplikation detektiert.

5. Diskussion

5.1 (Epi)genetische Veränderungen in 11p15 beim SRS

Beim SRS handelt es sich um ein Kleinwuchssyndrom, das assoziiert ist mit (epi)genetischen Mutationen innerhalb der Region 11p15. Diese Veränderungen sind genau gegensätzlich zu denen, die für das BWS beschrieben werden. Allerdings konnten bisher nicht alle Auffälligkeiten in 11p15, die für das BWS beobachtet wurden, auch in umgekehrter Form für das SRS identifiziert werden. Zur genaueren Charakterisierung und Einordnung der verschiedenen Veränderungen wurden in der vorliegenden Arbeit 72 Patienten mit typischem SRS sowie 188 Patienten der Routinediagnostik mit klinischen Merkmalen eines SRS mit Hilfe unterschiedlicher Verfahren untersucht.

5.1.1 Häufigkeitsbestimmung der ICR1-Hypomethylierungen bei SRS-Patienten und bei Patienten mit allgemeiner Wachstumsretardierung

Zur Häufigkeitsbestimmung von Hypomethylierungen der ICR1 in 11p15 bei 72 Patienten mit typischen SRS-Merkmalen, sowie 188 Patienten der SRS-Routinediagnostik und bei insgesamt 108 Patienten mit isolierter Wachstumsretardierung ohne SRS-Merkmale, wurde eine MS-MLPA angewendet.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es unter anderem, Häufigkeiten von Hypomethylierungen bei gut charakterisierten Patienten mit SRS mit denen bei Patienten der Routinediagnostik zu vergleichen. Des Weiteren sollte eine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich bei den beobachteten Hypomethylierungen bei Patienten mit SRS um ein SRS-spezifisches Merkmal handelt, oder ob diese epigenetische Veränderung auch mit einer SRS-unspezifischen Wachstumsretardierung assoziiert ist.

Bedingt durch eine geringe Erfahrung der behandelnden Ärzte mit seltenen Syndromen wie dem SRS erfolgt häufig eine ungenaue klinische Diagnosestellung. Aus diesem Grund ergibt sich eine wesentlich geringere Häufigkeit für ICR1-Hypomethylierungen bei Patienten mit SRS-Merkmalen der Routinediagnostik, als bei gut charakterisierten SRS-Kollektiven.

Die Frequenz von Hypomethylierungen der ICR1 beim SRS liegt nach Literaturangaben bei 38-63% (s. 2.2.2.2.3) (zur Übersicht: Eggermann et al., 2008a). In der vorliegenden Arbeit konnte in dem Gesamt-Kollektiv der typischen SRS-Patienten eine Häufigkeit von 38,8% im

Vergleich zu 14,9% bei den Patienten der Routine-Diagnostik bestimmt werden (Eggermann et al., 2008a; Eggermann et al., eingereicht).

Nach Erfassung genauerer klinischer Daten von 13 der 28 Patienten mit Hypomethylierung aus dem Diagnostik-Kollektiv stellte sich heraus, dass alle 13 betroffenen Patienten die typischen klinischen SRS-Merkmale aufwiesen und somit der klinische Befund molekulargenetisch bestätigt werden konnte. Bei drei dieser Patienten lag allerdings eine sehr milde postnatale Wachstumsretardierung vor. Lediglich die typische intrauterine Wachstumsretardierung sowie Asymmetrien und eine prominente Stirn wurden bei diesen drei Patienten als SRS-Merkmale beobachtet.

Nach den Diagnose-Kriterien von Netchine et al. (2007) werden relativ strikte Kriterien zur Diagnostik eines SRS festgelegt (s. 2.1). Durch die Anwendung dieser Kriterien wird eine sichere klinische Einordnung des SRS ermöglicht. Häufig werden jedoch auch SRS-Patienten beschrieben, die klinisch eher einen milden Phänotyp aufweisen, der Befund jedoch genetisch trotzdem bestätigt werden kann. Somit sollten, auch aufgrund mangelnder klinischer Routine der niedergelassenen Ärzte, mildere als die von Netchine et al. (2007) postulierten Kriterien als Maßstab zur Durchführung einer genetischen Diagnostik gewählt werden. Auch im Fall unserer drei SRS-Patienten mit Hypomethylierung und mildem klinischen Phänotyp wäre bei Anwendung der strikten Kriterien von Netchine et al. (2007) der Ausschluss einer SRS-Diagnostik erfolgt und somit ein falsch negativer Befund aufgrund der klinischen Einordnung erhoben worden.

Bei dem Vergleich von Detektionsraten der ICR1-Hypomethylierung bei Anwendung der MS-MLPA und des Southern-Blot-Verfahrens (s. 4.1.1) bei 43 gut charakterisierten SRS-Patienten, wurden abweichende Ergebnisse nachgewiesen. Mit Hilfe des Southern-Blots konnte bei 16 der 43 (37,2%) Patienten und mit der MS-MLPA bei 22 der 43 (51,2%) Patienten eine Hypomethylierung nachgewiesen werden (Eggermann et al., 2008c). Somit erfolgt eine starke Erhöhung der Detektionsrate bei Verwendung der MS-MLPA.

Anschließend erfolgte eine Analyse des genauen Methylierungszustandes der CTCF-Bindestelle 3 in der ICR1 mittels Bisulphit-Sequenzierung (s. 4.1.5) bei zwei der sechs Patienten mit diskrepanten MS-MLPA- / Southern-Blot-Ergebnissen (SR27K; SR30K) sowie einem Patienten (SR40K) mit Detektion einer Hypomethylierung in beiden Verfahren. Hierbei konnte eine fast vollständige Demethylierung bei SR40K nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte SR27K lediglich eine leichte Hypomethylierung und SR30K ein normales Methylierungsmuster innerhalb dieser Bindestelle. Das diskrepante Ergebnis der

beiden Anwendungen erklärt sich demnach vermutlich aus einer allgemein sehr milden Hypomethylierung bei beiden Patienten. Die Bisulphit-Sequenzierung der CTCF-Bindestelle 3 sowie der Southern-Blot mit Verwendung einer Sonde ausschließlich für die CTCF-Bindestelle 3 repräsentieren Methylierungs-Befunde zu sehr begrenzten Abschnitten der ICR1, während bei der MS-MLPA mehrere Sonden zur ICR1 Analyse verwendet werden. Somit lässt ein normaler Methylierungsbefund bei ausschließlicher Durchführung des Southern-Blots oder der Bisulphit-Sequenzierung einer einzelnen Region keinen genauen Befund zum Methylierungsstatus eines Patienten zu. Bei der MS-MLPA handelt es sich somit aufgrund der hohen Sensitivität sowie der Abdeckung eines größeren unterschiedlich methylierten Bereichs um die derzeitige Methode der Wahl.

Bei der Untersuchung von 20 Patienten mit isolierter intrauteriner Wachstumsretardierung (IUGR), 30 Patienten mit isolierter IUGR und postnataler Wachstumsretardierung (PGR) sowie 58 weiteren Patienten mit Wachstumsretardierung und zusätzlichen klinischen Auffälligkeiten, die nicht mit einem SRS assoziiert sind, konnte bei keinem der untersuchten Patienten eine Hypomethylierung der ICR1 nachgewiesen werden (Eggermann et al., 2008a; Schönherr et al., 2006). Somit handelt es sich bei einer ICR1-Hypomethylierung vermutlich um eine spezifische mit dem SRS assoziierte Veränderung, die zur molekulargenetischen Bestätigung für die Diagnose eines SRS verwendet werden kann. Auch weitere in der Literatur beschriebene Untersuchungen zur Spezifität von ICR1-Hypomethylierungen beim SRS bestätigten diesen Befund (zur Übersicht Eggermann et al., 2008a).

5.1.2 Relevanz seltener sowie bisher unbekannter 11p15-(Epi)mutationen beim SRS

Zum Nachweis bisher nicht in der Literatur beschriebener (Epi)mutationen in 11p15 bei Patienten mit SRS erfolgte eine spezifischere Analyse der MS-MLPA-Muster bei dem beschriebenen Kollektiv von 72 SRS-Patienten und 188 Patienten der Routine-Diagnostik mit SRS-Merkmalen (s. 4.1.2). Methylierungsdefekte innerhalb der zentromerischen ICR2 sowie Mikrodeletionen in 11p15 oder UPDs des Chromosom 11, wie sie für das BWS beschrieben sind, konnten innerhalb der vorliegenden Studie bei diesen Patienten nicht nachgewiesen werden (Eggermann et al., 2006; Eggermann et al., 2008c).

Allerdings können die beschriebenen (Epi)mutationen als eine mögliche Ursache für die Ausprägung eines SRS nicht ausgeschlossen werden. Wie zum Beispiel der Nachweis einer maternalen Duplikation ausschließlich der ICR2 bei bisher nur einem beschriebenen Patienten

(FN) mit SRS zeigt, können auch seltene (epi)genetische Auffälligkeiten bei Patienten mit SRS beschrieben werden, sodass eine Relevanz der hier untersuchten Auffälligkeiten gut vorstellbar ist.

Mit dem Nachweis einer maternalen Duplikation bei dem SRS-Patienten LE mit Hilfe der MS-MLPA konnte erneut eine der seltenen Veränderungen, die für das SRS bekannt sind, detektiert (zur Übersicht: Eggermann et al., 2005) und somit die Relevanz dieser Abberation für die Ätiologie des SRS bestätigt werden. Bis auf den oben erwähnten Fall des Patienten FN schließen alle bisher beschriebenen Duplikationen des Chromosoms 11 bei SRS-Patienten, einschließlich der des Patienten LE, die komplette Region 11p15 ein.

Bei der Duplikation von LE handelt es sich um eine unbalancierte Translokation chromosomalen Materials 11 auf dem p-terminalen Ende des Chromosoms 15. Die Mutter des Patienten weist diese Translokation ebenfalls auf, allerdings liegt sie bei ihr balanciert vor, sodass sich bei ihr keine Veränderung der Kopienanzahl chromosomalen Materials ergibt. Der Patient LE erbte das derivative Chromosom 15 mit dem translozierten Chromosom 11-Material sowie zusätzlich das normale Chromosom 11 von der Mutter, sodass durch das Hinzukommen des väterlichen Chromosoms 11 bei der Befruchtung drei Kopien des duplizierten Materials bei dem Patienten vorliegen.

Da es bei einer UPD(11)pat zu der Entstehung eines BWS kommt, stellt sich die Frage ob in der Familie von LE bei einer Vererbung des mütterlichen normalen Chromosoms 15 sowie des Chromosom 11 das die Deletion trägt, ein BWS bei Nachkommen mit dieser Aberration vorstellbar wäre. Wie bei einer UPD(11)pat würde auch hier das maternale Allel verloren gehen, wobei allerdings zusätzlich eine erniedrigte Expression aller nicht geprägten Gene innerhalb dieser Region vorläge, sodass ein weitaus schwererer Phänotyp bei Nachkommen mit dieser Deletion angenommen werden muss. Bisher sind in der Literatur keine Patienten mit BWS beschrieben, die eine maternale Deletion der kompletten Region 11p15 oder eine durchgängige UPD(11)pat, die nicht im Mosaik vorliegt, aufweisen. Dies lässt darauf schließen, dass ein kompletter Verlust des maternalen Allels von 11p15 in der frühen Entwicklung letal wirkt. Robinson et al. (2007) berichteten über einen Fall, bei dem ausschließlich in der Plazenta eine unbalancierte Translokation vorlag, die zu einem Verlust der maternalen Kopie 11p15.5 und einer partiellen Duplikation von 17q führte. Dieser genetische Befund verursachte einen Tod des Feten in der 34. SSW, eine mesenchymale Dysplasie der Plazenta sowie einen Großwuchs.

5.1.3 Ausschluss eines allgemeinen Hypomethylierungssyndrom beim SRS

Die Beobachtung einer generellen Hypomethylierung zusätzlicher, nicht direkt mit dem Syndrom assoziierten Loci bei Patienten mit den Imprinting-Syndromen TNDM (*transient neonatal diabetes mellitus*) und BWS (Mackay et al., 2006; Rossignol et al., 2006) (2.2.2.2.3) veranlasste in der vorliegenden Studie eine Suche nach allgemeinen Hypomethylierungen bei Patienten mit SRS. Die in der Literatur beschriebenen TNDM-Patienten mit allgemeinem Hypomethylierungssyndrom zeigen neben ihren generellen phänotypischen Auffälligkeiten weitere nicht-TNDM-spezifische Merkmale (Mackay et al., 2006). Da es sich auch beim SRS um ein Imprinting-Syndrom handelt, das mit einer Hypomethylierung der ICR1 assoziiert ist und es sich um ein klinisch heterogenes Syndrom handelt, wäre es denkbar, dass auch bei Patienten mit SRS solche allgemeinen Hypomethylierungen vorzufinden sind.

In der vorliegenden Studie wurde demnach analysiert, ob generelle Hypomethylierungen ein häufiges Merkmal von Imprinting-Erkrankungen darstellen und ob diese ebenfalls beim SRS auftreten.

In keiner der zehn analysierten Patienten mit SRS und UPD(7)mat und 22 Patienten mit ICR1-Hypomethylierung konnte eine Hypomethylierung der analysierten geprägten Loci in 6q24, 14q32 und der ICR2 in 11p15 detektiert werden (Schönherr et al., 2008). Aufgrund der geringen Anzahl von untersuchten Patienten kann die Relevanz einer Hypomethylierung weiterer elterlich geprägter Regionen oder eines allgemeinen Hypomethylierungssyndroms für das SRS allerdings nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Des Weiteren könnte eine Untersuchung zusätzlicher, unterschiedlich methylierter Regionen die Analyse erweitern. Tatsächlich könnte eine Hypomethylierung weiterer Regionen milde Unterschiede in den phänotypischen Merkmalen bei Patienten mit SRS erklären, sodass weitere Analysen zu generellen Hypomethylierungen besonders bei SRS-Patienten mit zusätzlichen klinischen Symptomen relevant sind.

5.2 Charakterisierung einer isolierten maternalen ICR2-Duplikation

Mit der Detektion einer 0,76-1,0 Mbp großen Duplikation bei dem SRS-Patienten FN konnte in der vorangegangenen Studie von Schönherr (2005) der erste Fall beschrieben werden, bei dem ausschließlich die zentromerische ICR2 in 11p15 betroffen ist (Schönherr et al., 2007a). Somit wurde die Relevanz auch dieser Region in 11p15 für das SRS bestätigt.

In der vorliegenden Arbeit konnte nun durch weiterführende Analysen sowohl eine engere Eingrenzung der duplizierten Region erfolgen, als auch die Entstehung und Segregation der Duplikation innerhalb der Familie näher definiert werden.

Eine Segregationsanalyse ergab, dass die Mutter von FN die Duplikation von ihrem Vater geerbt hat (s. Abb. 5.1). Da diese Duplikation jedoch in seiner DNA nicht nachzuweisen ist, handelt es sich vermutlich um eine Neumutation, die in seinen Keimzellen stattgefunden haben muss. Die Entstehung der Duplikation ist auf einen ungleichen Austausch von Material zwischen zwei Schwesterchromatiden eines Chromosom 11 in einer prämeiotischen Mitose zurückzuführen, da es sich um eine Tandem-Duplikation handelt, bei der das duplizierte Material vom selben Chromosom stammt. Im Anschluss daran erfolgte während der Meiose des Großvaters eine Rekombination zwischen seinen beiden homologen Chromosomen 11 innerhalb der telomerischen Kopie des duplizierten Segments zwischen den Markern 11-2357 und 11-2427. Da diese Rekombination lediglich eine der beiden Kopien, diese jedoch nicht vollständig sondern nur zwischen den Markern 11-2357 und 11-2427 betraf, kommt es somit zu einer Beibehaltung eines homozygoten Allelzustands und einer Herstellung heterozygoter Allelzustände bei unterschiedlichen Markern innerhalb der Duplikation, je nach ihrer Lokalisation. Diese Formationsmechanismen werden bei der Betrachtung des derivativen Chromosoms 11 bei der Mutter von FN ersichtlich.

Eine weitere Rekombination innerhalb der Duplikation von Chromosom 11 muss innerhalb der Keimbahn der Mutter von FN stattgefunden haben, da das mütterlich ererbte Chromosom 11 von FN innerhalb der duplizierten Region großväterliches sowie großmütterliches Material aufweist. Diese Rekombination betraf auch hier die zentromerische Kopie der duplizierten Region, wobei eine Rekombination der beiden großelterlichen Chromosomen 11 zwischen den Markern 11-2357 und 11-2427 in der Keimbahn der Mutter erfolgte.

Mit dem Ausschluss der Duplikation bei den unauffälligen und normalwüchsigen Geschwistern der Mutter von FN sowie bei dem normalwüchsigen zweiten Kind wird die Relevanz der Duplikation für die Ausprägung eines SRS weiter unterstützt. Des Weiteren konnte erst kürzlich in einer Studie von Vianna-Morgante et al. (2008) eine ähnliche Duplikation ausschließlich der ICR2 in einer weiteren Familie nachgewiesen werden. Bei fünf der sieben Kinder wurde eine Duplikation maternaler Herkunft detektiert. Während die Duplikationsträger SRS-spezifische Merkmale aufwiesen, waren sowohl die beiden Kinder ohne Duplikation als auch die Mutter, die die Duplikation von ihrem Vater geerbt hatte, klinisch unauffällig.

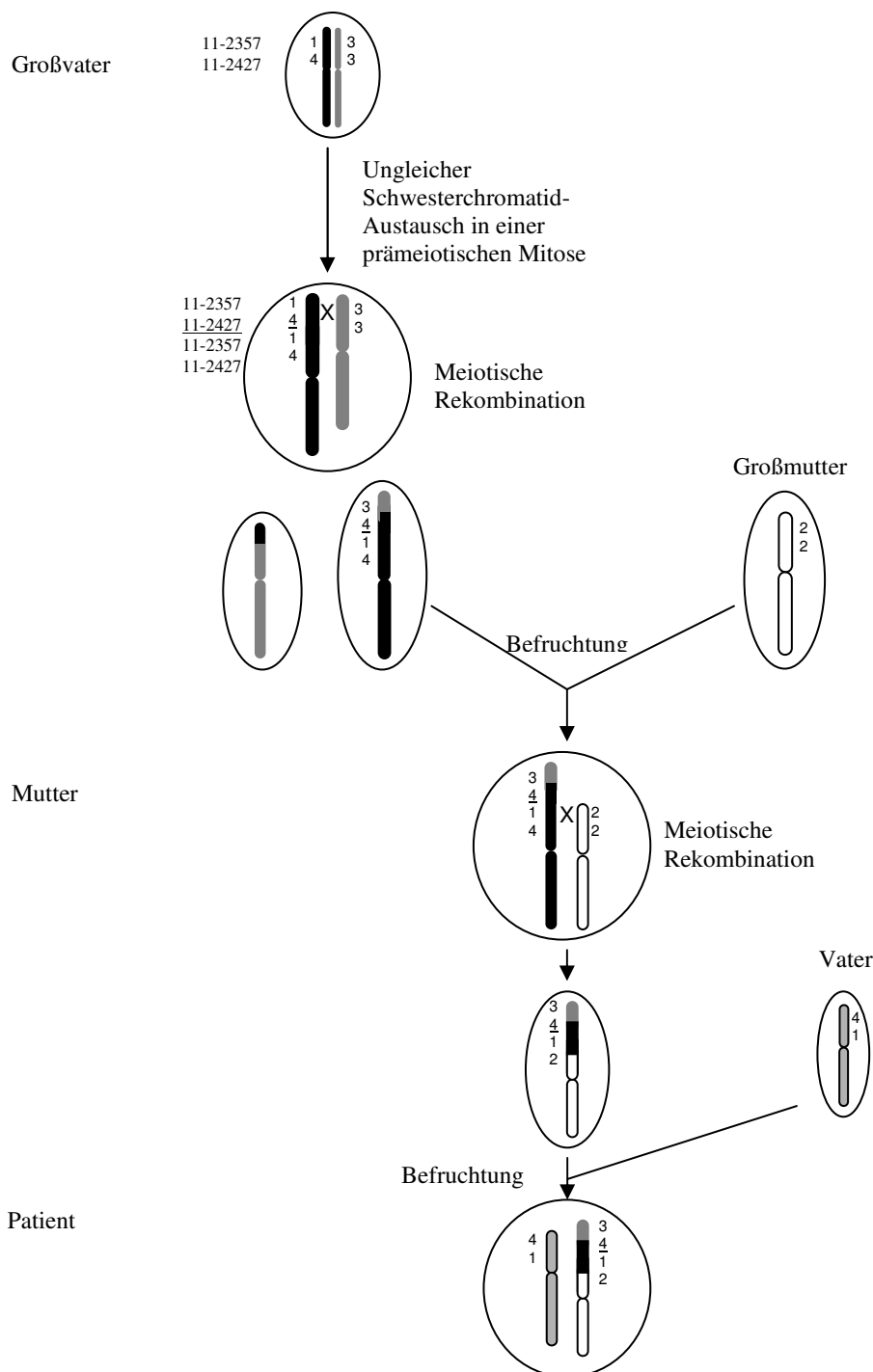


Abb. 5.1: Schematische Darstellung des Formations-Mechanismus der Duplikation bei Patient FN und seiner Familie.

Da die Mutter von FN dieselbe Duplikation trägt wie ihr Sohn, sie allerdings einen unauffälligen Phänotyp zeigt, kann man vermuten, dass in diesem Fall elterlich geprägte Faktoren an der Ausprägung des SRS beteiligt sind. Da die Mutter die Duplikation über das väterliche Chromosom geerbt hat und der Patient FN die Duplikation von seiner Mutter

erhielt, kann die unterschiedliche Expression relevanter Gene vom mütterlichen bzw. väterlichen Chromosom eine entscheidende Rolle spielen.

Nach Eingrenzung der Duplikation auf die ICR2 bei dem Patienten FN und seiner Mutter wurde das wachstumsinhibierende Gen *CDKN1C*, das innerhalb der duplizierten Region lokalisiert ist und ein Kandidatengen für das SRS darstellt, als verantwortlicher Faktor für die Ausprägung des SRS bei dem Patienten FN vermutet. *CDKN1C* wird lediglich vom maternalen Allel exprimiert, wodurch eine Duplikation des mütterlichen Allels theoretisch eine erhöhte Dosis dieses Genprodukts bewirken müsste, während eine paternale Duplikation eine normale Dosis zur Folge hätte.

Wie die quantitativen Analysen der *CDKN1C*-Expression zeigten, lag tatsächlich eine Expression beider Kopien innerhalb der Duplikation des maternalen Allels bei dem Patienten FN vor. Somit könnte sich ein vermindertes Wachstum bei diesem Patienten durch eine erhöhte Expression dieses Wachstumsinhibitors erklären.

Aufgrund der Expression von *CDKN1C* ausschließlich vom maternalen Allel ergibt sich für die Mutter, die die Duplikation paternal geerbt hat, keine Änderung der generellen Expression dieses Gens. Allerdings zeigte sich auch bei der Mutter in der quantitativen Analyse eine Expression beider Allele in ihren Lymphozyten. Wahrscheinlich ergibt sich dies jedoch lediglich durch eine verschobene Inaktivierung des elterlichen Imprintings (Algar et al., 2000) von *CDKN1C* in Lymphozyten und der daraus resultierenden milden Expression von *CDKN1C* vom paternalen Allel, was durch die Duplikation des paternalen Allels zusätzlich leicht verstärkt wird. Diese milde Dosiserhöhung hat keine Relevanz, da die verschobene Inaktivierung vermutlich nur in den Lymphozyten vorliegt und nicht in den für das Wachstum und die Entwicklung relevanten Geweben (Schönherr et al., 2007a).

Innerhalb der duplizierten Region ist ebenfalls das Gen *KCNQ1* lokalisiert. Bei *KCNQ1* (OMIM *607542) handelt es sich um das kodierende Gen des Proteins KVLQT1, das eine Komponente eines kardialen, spannungsabhängigen K⁺-Kanals darstellt. KVLQT1 interagiert mit ISK (*KCNE1*) (OMIM *176261), die zusammen den kardialen I(Ks) (slowly activating cardiac delayed rectifier) Kanal bilden, der zur Modulierung der Aktionspotentialdauer in den kardialen Myozyten dient. Eine Dysfunktion dieses Kanals kann zu plötzlichem Herzversagen führen. Mutationen innerhalb der Gene *KCNQ1* oder *KCNE1*, die einen Verlust der Funktion verursachen, führen zu einem Long-QT Syndrom, d.h. zu einer Verlängerung der QT-Phase in der Herzmuskelerregung.

Mutationen, die zu einem Funktionszugewinn führen, bewirken das Short-QT Syndrom, welches eine verkürzte QT-Phase verursacht. Da Patienten mit SRS keine bekannten kardialen Symptome aufweisen und *KCNQ1* bisher bei allen beschriebenen Duplikationen in 11p15 bei Patienten mit SRS mit eingeschlossen war, wurde eine Relevanz einer Duplikation dieses Gens für das SRS bisher ausgeschlossen. Allerdings wurde bei dem Patienten SR12K in der Microarray-Analyse (s. 4.6) eine Duplikation identifiziert, die die genomische Sequenz des Gens *KCNE1* beinhaltet. Da eine Rolle von *KCNQ1* in der Ätiologie des SRS nicht vollkommen ausgeschlossen ist wurden aufgrund dieser Ergebnisse quantitative Expressions-Analysen für *KCNQ1* bei dem Patienten FN und seiner Mutter durchgeführt.

Bei *KCNQ1* handelt es sich ebenfalls um ein elterlich geprägtes Gen, das lediglich vom maternalen Allel exprimiert wird. In der Expressionsanalyse zeigte sich eine nur leicht erhöhte Expression von *KCNQ1* bei der Mutter sowie eine stark erhöhte Expression bei dem Patienten FN. Bei der Mutter kann die minimale Expressionserhöhung vermutlich wie für *CDKN1C* erklärt werden, da bei ihr die Duplikation paternal vererbt wurde und das paternale *KCNQ1*-Allel normalerweise nicht exprimiert wird. Bei dem Patienten FN ergibt sich die erhöhte Expression durch eine maternale Duplikation und somit Verdopplung des maternal exprimierten Allels.

Im Kleinkindalter wurde bei FN eine milde Bradykardie festgestellt, die allerdings in späteren Untersuchungen nicht wieder beobachtet werden konnte.

Ob eine Duplikation und somit Dosiserhöhung des Proteins einen kardialen Defekt verursachen könnte muss durch weiterführende Analysen untersucht werden. Eine Relevanz für die Ätiologie des SRS selbst ist vermutlich auszuschließen.

5.3 Relevanz der untranslatierten RNA H19 für das SRS

Aufgrund der möglichen Bedeutung des Gens *H19* für die Ätiologie des SRS wurden in der vorangegangenen Studie von Schönherr (2005) 44 SRS-Patienten auf Mutationen innerhalb der genomischen Sequenz von *H19* untersucht. *H19* ist lokalisiert in 11p15 und wird ausschließlich vom maternalen Allel exprimiert. Seine Funktion ist bisher nicht bekannt, allerdings vermutet man, dass es in der Regulation des Imprintings der ICR1 und somit in der Expression des Wachstumsfaktors *IGF2* beteiligt sein könnte.

Bei drei Patienten wurden Varianten innerhalb der Sequenzen dieser nicht-kodierenden RNA detektiert. Um nachzuweisen, ob es sich bei den beschriebenen Mutationen um

Polymorphismen handelt, wurden 140 Kontrollpersonen auf diese Varianten untersucht (Schönherr et al., in Druck). In keiner der verwendeten Kontrollen konnten die beschriebenen Mutationen nachgewiesen werden.

Da die nachgewiesenen Mutationen einen Einfluss auf die mögliche *H19*-Funktion, zum Beispiel bei der Regulation der ICR1, haben könnten, wurden in der vorliegenden Arbeit Expressions- und Splicinganalysen zu den verschiedenen Varianten durchgeführt (Schönherr et al., 2008).

Bei der Analyse von alternativen Spliceprodukten von *H19* nach Transfektion von HEK293-Zellen mit Konstrukten der drei varianten Sequenzen erfolgte ein Nachweis von nahezu den gleichen Splice-Produkten bei allen verwendeten varianten Konstrukten im Vergleich zu denen der Wildtyp-Sequenz. Des Weiteren sind einige der entstehenden Transkripte in den Datenbanken beschrieben, sodass es sich vermutlich um gewöhnliche Splice-Varianten handelt.

Während für den Patienten SR17K (g.8616_8618delGGG) ein direkter Einfluss der bei ihm detektierten Deletion für das Splicing von *H19* ausgeschlossen werden konnte, wurde für den Patienten SR81K (g.8818_8820delAGG) eine quantitative Verschiebung der Expression der verschiedenen Transkripte beobachtet. Diese Verschiebung der Expression bewirkte einen fast vollständigen Verlust einzelner Transkripte, sodass diese Variante einen Einfluss auf die zellspezifische Funktion von *H19* haben könnte.

Bei der Patientin SR93K und ihrem gesunden Vater resultierte die Duplikation von 39 bp auf genomischem Level (g.9867_9905dup39) in einer Duplikation von 39 bp auf RNA-Ebene. Da diese Duplikation jedoch den Exon 2/Intron 2-Übergang einschließt, liegt eine Verdoppelung dieser Splice-Erkennungsstellen vor. Die Expressionsanalysen zeigten, dass es aufgrund dieser Duplikation zu einer alternativen Entstehung von zwei unterschiedlichen Splice-Produkten kommt, je nachdem, welche der beiden Erkennungsstellen genutzt wird. Bei der Wahl der 5'-lokalisierten Splicestelle entsteht das Wildtyp-Produkt, während bei der Verwendung der 3'-lokalisierten Erkennungsstelle die Bildung der varianten RNA mit einer Duplikation von 39 bp erfolgt. Die Analysen zeigten, dass einer Bevorzugung der 3'-lokalisierte Splicestelle sowohl bei der RNA aus transfizierten HEK293 sowie aus Lymphozyten der Patienten vorliegt.

Bei der Verwendung der 39 bp-Duplikation als Marker für die Expression der beiden elterlichen Allele in Lymphozyten bei der Patientin SR93K und ihrem Vater wurde eine monoallelische Expression bei der Patientin SR93K und eine Expression beider

Zustandsformen bei ihrem Vater nachgewiesen. Die Duplikation bei der Patientin ist von paternaler Herkunft, sodass sich die monoallelische Expression des maternalen Wildtyp-Allels durch die generelle Inaktivierung des paternalen Allels in den Lymphozyten erklärt. Der Vater erbte die Duplikation jedoch von seiner Mutter, wodurch bei ihm die Expression beider Zustandsformen nicht auf eine Expression beider elterlichen Allele zurückführen ist, sondern auf die Verwendung beider Splicestellen innerhalb der Duplikation (Wildtyp und zusätzliche durch die Duplikation erzeugte Erkennungsstelle) auf dem maternalen Allel. Da der Vater keine klinischen Symptome eines SRS aufweist, kann ein Effekt dieses varianten *H19*-Transkripts im Blut für das SRS ausgeschlossen werden.

Eine veränderte Regulation der *H19*-Expression auf dem paternalen Allel und somit zusätzliche Expression von *H19* vom paternalen Allel, ausgelöst durch die paternale Duplikation, konnte in den Lymphozyten von SR93K nicht beobachtet werden.

Neben der hier beschriebenen Variante konnte bei der Patientin SR93K ebenfalls eine Hypomethylierung der ICR1 mittels MS-MLPA detektiert werden. Es ist somit denkbar, dass es sich bei der *H19*-Mutation lediglich um einen seltenen Polymorphismus handelt und bei der Patientin SR93K der Methylierungsdefekt für die Ausprägung des SRS verantwortlich ist. Möglich wäre jedoch auch ein Einfluss *in cis* der Variante selbst auf die Erstellung des Methylierungsmusters in der ICR1. Bei dem Vater kann ein Effekt dieser Art ausgeschlossen werden, da er die Duplikation von seiner Mutter geerbt hat und das maternale Allel der ICR1 das unmethylierte Allel darstellt.

Da für *H19* bisher keine genaue Funktion bekannt ist, man jedoch einen engen Zusammenhang dieser untranslatierten RNA mit der Regulation des Imprintings in 11p15 vermutet, ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei der Detektion von Varianten bei drei von 44 Patienten um Polymorphismen handelt. Des Weiteren handelt es sich bei *H19* um eine in der Evolution hoch konservierte Sequenz (Brannan et al., 1990). Kürzlich detektierten Cai und Cullen (2007) *in vivo* die microRNA miR-675, die aus der genomischen *H19*-Sequenz hervorgeht.

Somit gibt es verschiedene Möglichkeiten eines Effekts der detektierten *H19*-Mutationen:

Bei dem Patienten SR81K wäre es denkbar, dass durch die verschobene Expression von *H19* die benötigten Transkripte zur Synthetisierung der funktionellen miRNA von *H19* nicht in der ausreichenden Menge vorliegen. Dadurch könnte die Funktion von *H19* selbst oder nachgeschalteter regulatorischer Elemente beeinflusst werden. Obwohl die detektierten Varianten nicht in der direkten Sequenz der miR-675 lokalisiert sind, könnten sie dennoch die

primäre miRNA, die die vorläufige miR-675 bildet, betreffen und somit einen Einfluss ausüben.

Des Weiteren könnte durch die detektierten Varianten die richtige Faltung der H19 RNA gestört werden, sodass die bisher unbekannte Funktion der untranslatierten RNA beeinflusst wird.

Bei dem Patienten SR81K wäre es denkbar, dass die starke Verminderung der Expression einzelner Transkripte eine gestörte zelluläre Funktion in relevanten Geweben hervorruft, in denen genau diese Transkripte eine wichtige Funktion ausüben.

Die 39bp-Duplikation bei der Patientin SR93K könnte einen Umbau wichtiger Chromatinstrukturen bewirken, der die Expression benachbarter Gene beeinflusst. Die genomische Sequenz von *H19* ist innerhalb eines speziellen Chromatin-Konstruktes lokalisiert (Kurukuti et al., 2006), das durch Veränderung seiner Struktur die Expression einzelner Gene und somit das Imprinting der ICR1 beeinflusst, indem es die Interaktion verschiedener Promotoren mit Enhancer-Elementen reguliert. Eine Veränderung in der Länge der genomischen Sequenz von *H19* könnte somit einen Einfluss auf diese räumliche Struktur und dadurch auf die Regulation der Expression relevanter Gene haben.

Wagschal und Feil (2006) vermuteten, dass neben der DNA-Methylierung weitere Faktoren, wie zum Beispiel nicht-kodierende untranslatierte RNAs, einen Einfluss auf das elterliche Imprinting haben. So könnte zum Beispiel eine veränderte *H19*-Sequenz das Imprinting wachstumsrelevanter Gene stören.

Zur Beurteilung der genauen Relevanz der varianten *H19*-Sequenzen für das SRS sind somit weitere Analysen notwendig, die eine genauere Funktion dieser untranslatierten RNA ermöglichen sollten.

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

Bei 7-10% der Patienten mit SRS können Duplikationen oder maternale UPDs des Chromosoms 7 beobachtet werden. Während bisher lediglich einzelne Fälle von Duplikationen ausschließlich des p-Arms von Chromosom 7 nachgewiesen wurden (zur Übersicht: Eggermann et al., 2008a), handelt es sich bei den UPDs(7)mat um die häufiger vorliegende Aberration (s. 2.2.2.1). Bei der Analyse von UPDs(7)mat bei den beiden verwendeten SRS-Kollektiven konnte, ebenso wie bei der Detektion von Methylierungsdefekten in der ICR1 mit der MS-MLPA (s. 5.1.1), gezeigt werden, dass eine höhere Detektionsrate bei gut charakterisierten Kollektiven (12,5%) im Vergleich zu

Patienten der SRS-Routinediagnostik (2,3%) zu erwarten ist. Dennoch sollten auch für diese molekulargenetische Diagnostik die Kriterien zu ihrer Durchführung nicht verschärft werden, da vor allem bei Patienten mit UPD(7)mat häufig ein milderer SRS-Phänotyp vorliegt. Bei einer Diagnostik lediglich der Patienten mit typischen SRS-Merkmalen könnten somit einzelne Patienten übersehen werden.

Mit der Beschreibung von bisher zwei SRS-Patienten in der Literatur (Hannula et al., 2001; Reboul et al., 2006), die eine segmentale UPD(7)mat ausschließlich eines bestimmten Abschnitts des q-Arms aufwiesen, wurde neben der Duplikationsregion in 7p zusätzlich in 7q eine Kandidatenregion für das SRS auf Chromosom 7 festgelegt. Sowohl 7p12-p11.2 als auch 7q31-qter beinhalten elterlich geprägte Abschnitte, die der Regulation der Kandidatengene *GRB10* in 7p und *PEG1/MEST* in 7q dienen. In der vorliegenden Arbeit konnten zwei weitere SRS-Patienten mit segmentaler UPD(7)mat detektieren werden (Eggermann et al., 2008d), bei denen ebenfalls die geprägte Region in 7q mit *PEG1/MEST* betroffen ist. Diese Ergebnisse unterstützen die relevante Funktion dieser Region und somit des Kandidatengens *PEG1/MEST* für die Ätiologie des SRS.

Für Patienten mit dem „Maternalen UPD14 Syndrom“ konnten kürzlich isolierte Imprinting Mutationen beschrieben werden (Temple et al., 2007). Aufgrund der segmentalen UPDs(7)mat beim SRS, die immer den elterlich geprägten Locus mit dem Kandidatengen *PEG1/MEST* einschließen, wurden in der vorliegenden Studie Untersuchungen hinsichtlich eines isolierten Methylierungsdefekts dieses *PEG1/MEST*-Locus durchgeführt. Obwohl bei keinem der analysierten SRS-Patienten solche Veränderungen nachgewiesen werden konnten (Schönherr et al., 2008) kann eine Beteiligung solcher Methylierungsdefekte an der Ätiologie des SRS nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Da das maternale Allel methyliert ist, hätte eine Hypermethylierung denselben Effekt wie eine UPD(7)mat. Die reduzierte Expression des wachstumsrelevanten Gens *PEG1/MEST*, das paternal exprimiert wird, könnte somit möglicherweise in einem verminderten Wachstum resultieren und einen Einfluss für die Ätiologie des SRS besitzen.

Bei einem isolierten Methylierungsdefekt in 7q handelt es sich demnach durchaus um einen denkbaren Mechanismus zur Ausprägung eines SRS. Da es sich beim SRS um ein sehr heterogenes Syndrom handelt, für das bereits einige sehr selten auftretende (epi)genetische Auffälligkeiten beschrieben wurden, könnten weitere Untersuchung in einem größeren SRS-Kollektiv näheren Aufschluss zu einer möglichen Rolle dieser Veränderung liefern.

5.5 Interchromosomale Interaktionen der geprägten Regionen auf Chromosom 11 und 7

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war der Nachweis einer möglichen funktionellen Verbindung zwischen den unterschiedlichen elterlich geprägten Regionen, die mit dem SRS assoziiert sind. Um eine denkbare räumliche Interaktion der Region in 11p15 mit 7q21-qter oder 7p12-p11.2 detektieren zu können, wurden ein ACT-Assay sowie FISH-Analysen durchgeführt. Ähnliche chromosomale Interaktionen zwischen spezifischen Regionen der Maus-Chromosomen 7 und 11 wurden kürzlich von Ling et al. (2006) nachgewiesen.

Zur Durchführung beider Untersuchungen wurden Trophoblasten-Zellkulturen verwendet, da es sich hierbei um embryonales Gewebe handelt und beim SRS bereits das Wachstum des Fetus sowie der Plazenta während der Embryonalentwicklung gestört ist. Eine Analyse placentaren Materials lässt somit die genauesten funktionellen Erkenntnisse für die hier relevanten Vorgänge zu.

Um zunächst die grundlegenden Zusammenhänge der analysierten Regionen während der normalen Entwicklung untersuchen zu können, wurden die durchgeführten Analysen an Trophoblasten-Zellkulturen von Plazenten unauffälliger Schwangerschaften durchgeführt.

Bei der Durchführung der FISH-Analysen wurde jeweils eine Sonde verwendet, die gegen 11p15 gerichtet war, sowie solche gegen 7q32 (*MEST*) oder 7p12-p11.2 (*GRB10*). Zur Bestätigung einer Kolo-kalisation sollten die Sonden innerhalb eines Interphase-Kerns möglichst nah beieinander lokalisiert sein oder, bei einem sehr geringen Abstand zueinander, sogar ein Mischsignal erzeugen. Mit Hilfe dieser FISH-Analysen konnte in einigen Zellkernen eine Assoziation chromosomalen Materials der Region 11p15 mit den geprägten Regionen von *GRB10* in 7p und *PEG1/MEST* in 7q bestätigt werden.

Für die Kombination von *H19* / *GRB10* konnte bei insgesamt 106 Aufnahmen in sechs Fällen eine Kolo-kalisation jeweils eines Allels der *H19*- und einer *GRB10*-Sonde nachgewiesen werden. Für *H19* / *PEG1/MEST* wurde in vier von 37 Aufnahmen eine Kolo-kalisation bestätigt, wobei in drei dieser vier Fälle eine Interaktion jeweils eines Allels und in einem Kern sogar zwei Interaktionen beider Sonden vorlagen. Es handelt sich hierbei um eine geringe Rate von beobachteten Interaktionen, was allerdings durch die schlechte Visualisierung der Signale bedingt ist. Ein Nachweis aller vier Signale in einem Kern konnte für alle analysierten Kerne von *H19* / *GRB10* und *H19* / *PEG1/MEST* insgesamt in sechs Fällen erzielt werden, wobei niemals eine Detektion aller vier Signale getrennt voneinander stattfand.

Es ist somit nicht auszuschließen, dass in den übrigen Kernen, in denen kein Nachweis aller vier Signale möglich war, ebenfalls eine Kolo-kalisation vorlag und die tatsächliche Rate somit höher ist. Rechnet man nur die Kerne in die Analyse mit ein, bei denen alle vier Signale detektiert werden konnten, so kann bei der Kombination von *H19* / *GRB10* in vier von vier Aufnahmen und bei *H19* / *PEG1/MEST* bei zwei von zwei Aufnahmen eine Interaktion nachgewiesen werden.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse in einem weiteren Zellsystem wurden zusätzlich Lymphozyten-Präparate normalwüchsiger Kontrollpersonen für die beschriebenen Analysen verwendet. Auch hier konnten in drei von insgesamt 12 Aufnahmen bei Verwendung der Sonden *H19* / *GRB10* alle vier Signale detektiert werden, wobei in zwei dieser drei Zellkerne eine Interaktion jeweils eines der beiden Signale vorlag. Im dritten Zellkern war zum ersten Mal eine räumlich getrennte Detektion aller vier Signale möglich. Somit ähneln sich die Ergebnisse der Trophoblasten- und Lymphozyten-Präparate. Dies könnte einen Aufschluss darüber geben, dass die möglichen Mechanismen, die eine Interaktion dieser Regionen verursachen, nicht nur während der Embryonalentwicklung, sondern auch in späteren zellulären Prozessen sowie in unterschiedlichen Geweben einen Einfluss haben.

Möglicherweise könnten regulative Faktoren, wie zum Beispiel Transkriptionsmaschinerien, unter Beteiligung verschiedener Proteine, eine gemeinsame Regulation der untersuchten Regionen beeinflussen (Ling et al., 2006).

Des Weiteren ist eine gegenseitige Beeinflussung der drei Regionen, bedingt durch die räumliche Nähe zueinander, denkbar. Durch die Interaktion verschiedener Chromatinabschnitte der Regionen könnte es zu einer Regulation der Transkription oder des Imprintings, z.B. durch verschiedene Enhancer-Elemente, kommen. Eine Interaktion dieser drei elterlich geprägten Regionen, die jeweils wachstumsrelevante Gene beinhalten, könnte somit regulative Prozesse des Wachstums und der Entwicklung beeinflussen.

Ausgenommen in einem Kern konnte immer eine Interaktion lediglich eines Allels von 11p15 mit einem Allel von 7p bzw. 7q nachgewiesen werden. Dies verstärkt die Vermutung, dass es sich um eine Interaktion handelt, bei der das Imprinting der Allele eine wichtige Rolle spielt. Da innerhalb dieser geprägten Regionen, je nach Herkunft des elterlichen Allels, eine unterschiedliche Expression der Gene vorliegt, ist eine gegenseitige Beeinflussung jeweils nur eines elterlichen Allels durchaus denkbar.

Bei der Durchführung des ACT-Assays wurde eine Interaktionssuche für die *H19*-DMR in 11p15 mit der unterschiedlich methylierten Region des Gens *GRB10* in 7p12-p11.2 und/oder der maternal methylierten Promotor-Region des Gens *PEG1/MEST* in 7q32 durchgeführt.

Es konnte in diesem Ansatz bisher zwar keine Assoziation der *H19*-DMR mit einer der beiden Regionen auf Chromosom 7 in Trophoblasten-Kulturen bestätigt werden, jedoch kann dies vermutlich auf die bisher unzureichende Etablierung des Verfahrens zurückgeführt werden. Eine chromosomale Interaktion dieser Regionen kann alleine aufgrund der Ergebnisse der FISH-Analysen nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Bei weiterführenden Untersuchungen sollten zusätzliche Enzyme sowie Primer zur Durchführung des Assays verwendet werden.

5.5.1 Potentielle Regulation der mit dem SRS assoziierten Regionen durch gemeinsame Faktoren

Bei CTCF handelt es sich um ein DNA bindendes Protein, das vermutlich an der Regulation aller Insulator-Elemente der Vertebraten beteiligt ist. Insulatoren sind DNA-Strukturen, die der Regulation von Enhancer- und Silencer-Elementen dienen. Je nach genomischer Bindestelle kann CTCF somit durch Regulation der Insulator-Struktur als transkriptioneller Repressor oder Aktivator dienen (Jeong und Pfeifer, 2004).

CTCF spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation des Imprintings der telomerischen ICR1 in 11p15. Während eine Bindung von CTCF an das unmethylierte maternale Allel eine Chromatinstruktur verursacht, die den *H19*-Promotor in räumliche Nähe zu einem Enhancer-Element befördert und somit eine Expression von *H19* bewirkt, wird auf dem paternalen Allel eine Bindung von CTCF durch Methylierung seiner Bindestellen verhindert. Dadurch wird eine Aktivierung der Expression von *IGF2* durch eine veränderte räumliche Chromatinstruktur bewirkt (Maher et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit sollte der Nachweis erbracht werden, ob CTCF ebenfalls der Transkriptions-Regulation der beiden Kandidatengene *GRB10* in 7p und *PEG1/MEST* in 7q dient.

Die Ergebnisse der quantitativen Real-Time PCR nach Transfektion von Trophoblasten-Zellkulturen mit CTCF zeigte eine deutliche Inhibition der Transkription von *PEG1/MEST*. Die Transkription von *GRB10* wurde in den durchgeführten Analysen leicht erhöht. Da jedoch die Expression des Referenzgens *TBP* um das gleiche Ausmaß nach oben reguliert

wurde handelt es sich hierbei vermutlich um einen Einfluss äußerer Faktoren und nicht durch CTCF selbst.

Bei *PEG1/MEST* handelt es sich um einen wachstumsfördernden Faktor, dessen Expression, nach Grundlage der in dieser Arbeit erzielten Erkenntnisse, durch CTCF erniedrigt wird. Auch in 11p15 bewirkt CTCF die Formierung einer Chromatinstruktur, die eine Expression des wachstumsfördernden Faktors *IGF2* verhindert. Somit scheint die Regulation dieser beiden mit dem SRS assoziierten Regionen einem gemeinsamen Mechanismus zu unterliegen. Die Störung eines übergeordneten regulativen Elements könnte demnach eine Beeinflussung beider Regionen verursachen. Da CTCF jedoch vermutlich ein Regulator aller Insulator-Elemente der Vertebraten darstellt, ist es unwahrscheinlich, dass ein Defekt seiner Funktion lediglich zur Ausprägung eines SRS führt.

Vorstellbar ist allerdings, dass diese gemeinsame Regulation eine Erklärung für die Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten FISH-Analysen (s. 5.5) darstellt. Durch eine räumliche Kolo-kalisation der Chromatinregionen von 11p15 und 7q32 könnte eine parallele Regulation der Expression von *H19*, *IGF2* und *PEG1/MEST* induziert werden. Eine (epi)genetische Veränderung einer der beiden Regionen, wie z.B. eine Hypomethylierung der ICR1 oder UPD(7)mat, könnte diese Interaktion stören und somit die normale Regulation der beteiligten Gene beeinflussen.

Denkbar wäre es auch, dass es einen gemeinsamen Signalweg dieser mit dem SRS assoziierten Faktoren gibt, der zur Steuerung des Wachstums benötigt wird. Somit könnte eine übergeordnete Störung ihrer Expression zur nachgeschalteten Beeinflussung dieses Signalwegs und somit zur Ausprägung eines SRS führen.

5.6 Verwendung der Microarray-Technologie für die Diagnostik des SRS

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Etablierung der 500K-Microarray-Technologie zur Detektion von Mutationen der Kopienanzahl bei SRS-Patienten. In einer nachfolgenden Studie (Spengler, 2008) sollte diese etablierte Methode zur Analyse eines größeren Kollektivs von Patienten mit SRS verwendet werden.

Bei der Verwendung von zwei Kontroll-Proben konnten die erwarteten Ergebnisse bestätigt werden. Der Nachweis der Duplikation in 11p15 bei dem Patienten FN belegte die Detektionsfähigkeit von numerischen Aberrationen durch das verwendete Verfahren.

Einer der beiden untersuchten SRS-Patienten, für die noch keine ursächliche Mutation bekannt war, zeigte unauffällige Werte der Microarray-Analyse, während bei dem Patienten SR12K und seinem Vater eine Duplikation von ca. 0,5 Mbp in 21q22.11-q22.12 nachgewiesen und mittels Mikrosatelliten-Analysen bestätigt werden konnte. Die Detektion der kodierenden Sequenz für *KCNE1* innerhalb dieser Duplikation veranlasste die quantitative Expressionsanalyse des Gens *KCNQ1* bei der Familie FN. Bei FN und seiner Mutter wurde eine Duplikation in 11p15 nachgewiesen, die die komplette kodierende Sequenz des Gens *KCNQ1* beinhaltet. Da *KCNQ1*, ebenso wie *KCNE1*, jedoch für jeweils eine der beiden Komponenten eines kardialen I(Ks) (slowly activating cardiac delayed rectifier) Kanals kodieren und Patienten mit SRS keine kardialen Defekte aufweisen, wurde die Duplikation dieses Gens zunächst nicht als relevant angesehen. Erst die Detektion der Duplikation von *KCNE1* bei dem Patienten SR12K gab den Anstoß zu den unter 5.2 diskutierten Analysen. Die Sequenz von *KCNE1* ist komplett innerhalb des in der Literatur beschriebenen Kopienzahl-Polymorphismus 34534 (UCSC) enthalten, sodass man keinen Effekt der Duplikation der genomischen Sequenz dieses Gens vermutet. Jedoch handelt es sich bei dem Kontroll-Kollektiv, bei dem dieser Polymorphismus beschrieben wurde, um ein schlecht charakterisiertes Kollektiv, zu dem keine genaueren klinischen Angaben bekannt sind. Somit ist eine kardiale Problematik, die eventuell erst in einem höheren Alter der Patienten auftreten könnte, nicht ausgeschlossen.

Da die detektierte Duplikation scheinbar über den beschriebenen Polymorphismus hinausgeht, könnte möglicherweise ein Einfluss dieses zusätzlich duplizierten Bereichs für das SRS vermutet werden. Es handelt sich hierbei jedoch lediglich um ungenaue Angaben der Duplikationsbruchpunkte durch die Daten des Microarrays. Diese Problematik ist bereits bekannt. Des Weiteren befinden sich in diesem zusätzlichen Bereich keine Gene, die eine Rolle in der Wachstumsregulation besitzen, sodass eine Relevanz dieser Duplikation für das SRS bei dem Patienten SR12K und seinem Vater zunächst nicht vermutet wird.

5.7 Ausblick

Bei der Analyse von (Epi)mutationen in 11p15 bei Patienten mit SRS konnte ein deutlicher Unterschied der Häufigkeit von Hypomethylierungen der ICR1 bei Patienten der Routinediagnostik im Vergleich zu gut charakterisierten SRS-Patienten festgestellt werden. Zukünftig sollten diagnostische Kriterien festgelegt werden, die einen sinnvollen Rahmen zur genetischen Diagnostik bei Patienten mit SRS-Merkmalen vorgeben.

Die bisher nicht in der Literatur beschriebenen (epi)genetischen Veränderungen in 11p15, die bereits in gegensätzlicher Form für das BWS bekannt sind, sollten weiterhin nicht als mögliche Ursache für ein SRS außer Acht gelassen werden, sondern routinemäßig mit Hilfe der MS-MLPA analysiert werden. Wie der Fall der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen isolierten maternalen Duplikation der ICR2 bei dem SRS-Patienten FN zeigt, kann der Nachweis solcher seltenen Veränderungen zu einem besseren Verständnis der genetischen Grundlagen des SRS verhelfen.

Bei dem Patienten FN mit einer maternalen ICR2-Duplikation müssen funktionelle Analysen zukünftig klären, ob es sich bei der nachgewiesenen erhöhten *CDKN1C*-Expression um die für das SRS ursächliche Veränderung handelt. Obwohl eine Relevanz der Dosiserhöhung der *KCNQ1*-Expression für die Ätiologie des SRS vermutlich auszuschließen ist, sollte dennoch untersucht werden, ob sie einen negativen Einfluss auf die kardiale Funktion ausübt.

Des Weiteren sollten Untersuchungen zu einer generellen Hypomethylierung bei SRS-Patienten auch zukünftig stattfinden. Während in der vorliegenden Arbeit lediglich Patienten mit typischen SRS-Merkmalen auf eine Hypomethylierung zusätzlicher elterlich geprägter Regionen analysiert wurden, sollte der Schwerpunkt im Weiteren auf die Untersuchung von SRS-Patienten mit zusätzlichen phänotypischen Merkmalen gesetzt werden.

Nach der genaueren Analyse von Splicemutationen bei den drei SRS-Patienten mit varianten *H19*-Sequenzen müssen nun weiterführende funktionelle Analysen angeschlossen werden, um eine Relevanz dieser beobachteten Veränderungen bestimmen zu können. Untersuchungen zur Klärung der eigentlichen Funktion dieser untranslatierten RNA stehen hierbei im Vordergrund. Zu diesem Zwecke würden sich Analysen anbieten, die Interaktionen von *H19* mit verschiedenen DNA-Regionen oder Proteinen aufdecken, oder solche, die einen funktionellen Verlust dieser RNA in Zellkulturen verursacht, um einen daraus resultierenden Effekt nachweisen zu können.

Ein Nachweis weiterer SRS-Patienten mit segmentalen UPDs(7)mat könnte dabei helfen eine SRS-relevante Region auf Chromosom 7 näher einzugrenzen. Hierzu sollten bei einem positiven Befund der MS-PCR für 7q32 auch zukünftig Mikrosatelliten-Analysen angeschlossen werden. Somit wäre es gleichzeitig möglich bisher nicht beschriebene isolierte Methylierungsdefekte für 7q32 bei Patienten mit SRS von UPDs(7)mat abzugrenzen. Eine Relevanz dieser isolierten Methylierungsdefekte von 7q für die Ätiologie einzelner SRS-Fälle kann bisher nicht ausgeschlossen werden.

Zur Bestätigung einer interchromosomalen Interaktion zwischen den SRS-Kandidatenregionen 11p15 und 7p bzw. 7q müssen sensitivere FISH-Analysen durchgeführt werden, um eine bessere Aussage zur Häufigkeit von Interaktionen treffen zu können. Mit der Etablierung eines spezifischeren ACT-Assays oder alternativen Methoden sollte eine Bestätigung der FISH-Ergebnisse möglich werden.

Um den Einfluss von CTCF auf die Expression von *PEG1/MEST* besser zu beurteilen, könnten zum Beispiel ChIP (Chromatin-Immunopräzipitations)-Analysen durchgeführt werden, die eine mögliche Bindung des Proteins CTCF an die Chromatinregion von *PEG1/MEST* nachweisen könnten. Zur Beurteilung der Relevanz von Störungen dieser Interaktionen sind zukünftige Untersuchungen an plazentarem Material von SRS-Patienten denkbar.

Weitere Microarray-Analysen bei einem größeren Kollektiv von SRS-Patienten sollten die Detektion bisher unbekannter Aberrationen der Kopienzahl ermöglichen. Auch die Verwendung neuerer Microarray-Systeme mit einer höheren Auflösung und somit besseren Detektionsrate sind in näherer Zukunft vorstellbar.

6. Anhang

Tab. 6.1: Primerbedingungen zur Expressionsanalyse von *CDKN1C* bei Verwendung der Fragmentanalyse mittels Silberfärbung

Fragment	Primer-bezeichnung	Produkt-größe (bp) (WT/MUT)	Primersequenz (5'→3')	Verwendetes PCR-System / T _A
<i>CDKN1C</i> Fragment C Exon 2	CDKN1C-C-F CDKN1C-C-R	307/295	agtggaccgaagtggacagcgac ggggccaggaccgcgacc	Taq PCRx DNA Polymerase, recombinant, Invitrogen / 60°C

Tab. 6.2: Primerbedingungen zur Expressionsanalyse von *H19* bei Verwendung der Fragmentanalyse mittels Silberfärbung

Fragment	Primer-bezeichnung	Produktgröße (bp) WT/MUT-Allel	Primersequenz (5'→3')	Verwendetes PCR-System / T _A
<i>H19</i> - Exon1/Exon4	H19-1.7F2 H19-TaqR	454/493	agtgaatgagctctcaggag tgtgtccggattcaaaggcc	Taq DNA Polymerase, Qiagen / 57°C

Tab. 6.3: Verwendete Primer für die Mikrosatelliten-Analyse der Chromosomen 7, 11 und 21

Primer-bezeichnung	Entfernung von pter (Mbp)	Produktgröße (bp)	Primersequenz (5'→3')
Chromosom 7-Marker:			
D7S493-F D7S493-R	21,77	194-224	ggaagtcccagccatagtt gaaagcacttacactgaggattt
D7S529-F D7S529-R	25,35	218-226	aaatctagacatgcctgtaa ggtaccatcaccacaatcaa
D7S526-F D7S526-R	30,91	124-135	aacaaggcttctgctgag ccatcttggtgtgagggc
D7S2469-F D7S2469-R	41,09	150-172	attcaatatctcctcatgggtg atcgacatcctggtgtgtg
D7S2422-F D7S2422-R	51,1	195-227	gctccacattccttgggta aagtgagggccttcaaac
D7S2429-F D7S2422-R	62,17	173-183	cagtgtctggagttgtcaag ctgggagtcgaagtg
D7S663-F D7S663-R	66,35	153-173	attcaaaaagcagtttgcaa ccagcctggcaacaca
D7S630-F D7S630-R	88,28	198-222	tccattctgaggtttgatgt ccatggtctttcaatgaac
D7S657-F D7S657-R	92,64	245-264	gtcacagcacagttttgg gtcaagtagagattgagattcc
D7S618-F	97,15	120-158	aagacccagtctcaagaag

D7S618-R			tttcagatgatgaaaccgatg
D7S792-F D7S792-R	103,29	~154	gtctcttcatttatgcttttg agtgtatggatcagagagacagg
D7S2446-F D7S2446-R	103,78	185-210	tttgagtcttcacagcagttg gggaggttgattccacagt
D7S501-F D7S501-R	106,22	163-179	caccgttgtgatggcagag atttcttaccaggcagactgct
D7S523-F D7S523-R	111,48	223-240	ctgattcatagcagcacttg aaaacatttcattaccactg
D7S2452-F D7S2452-R	133,07	187-203	tccagcatgagttgagaag ggcattgaagtttatcgtga
D7S636-F D7S636-R	150,33	130-168	ggagtgactgggcaggaa agcttgtgtggggttca
D7S1540-F D7S1540-R	150,64	~186	ccccttccttatcatttc aaagccaatcactgagac
D7S483-F D7S483-R	151,82	166-188	agtggtcattagccttggcaaaatc aaccagagttgtaagccatgaaagt
Chromosom 11-Marker:			
D11S1984-F D11S1984-R	1,53	170-202	gggtgacagagcaaaattct acacctggatcttggactca
D11S4046-F D11S4046-R	1,93	183-203	actccagcctgggaac tgatagacacaccattgc
D11S1318-F D11S1318-R	2,28	123-145	cccgatggcaacagg tgtgcatgtncatgagtg
11-2305-F 11-2305-R	2,30	~173	gggtgacagagcaagaca ttaccttggccctgtt
11-2357-F 11-2357-R	2,35	~237	gttgcagtgagccaagatc gactggccgtttctcaaaat
11-2427-F 11-2427-R	2,42	~224	cagcccttctcaaacttg actcaaccaaaggatcccaaa
D11S4088-F D11S4088-R	2,71	204-252	gggcagaggcagtgagg gcatgttcgggggtg
11-2820-F 11-2820-R	2,82	~114	cacagaaccagcatgtc accagaggccagaaatgtc
11-2849-F 11-2849-R	2,85	~233	agggaggaagaaaggaaagaa gttgggccagattcactc
11-31174-F 11-31174-R	3,11	~201	cctttcaggcatccatcc gtgaatgggaaggaaggtg
11-3396-F 11-3396-R	3,39	~105	cagtgagcagagattgcg gaacaccagcccttcta
11-3648-F 11-3648-R	3,64	~179	accaggatagtcccacc gcctcctcccatagattactg
11-3800-F 11-3800-R	3,80	~257	cccaagctttttcttcttct caagattgtgccactgca
11-3973-F 11-3973-R	3,97	~108	tttcttgccttctcttgtgta aggggggatttaggcttatg
D11S1758-F D11S1758-R	4,70	232-276	gtcaaggtagcccaggaaat ccagtgttctcaciaaactgagta
D11S4181-F	4,73	201-217	gggcacctgtaatccca

D11S4181-R			gaactgagaccaagaacattattcc
D11S4188-F D11S4188-R	9,03	109-123	taacaccatcaaataaccagg tttatccagaaggcagca
D11S875-F D11S875-R	10,99	103-125	tacagagctgagttttagc actgtcctctcactactg
D11S1334-F D11S1334-R	12,92	134-150	tgcagcatagnctgt agctttattgaaagtcattttg
Chromosom 21-Marker:			
21-3455-F 21-3455-R	34,55	228-234	ggccagaagccagtagta afaaccrrrffacafcca
21-3456-F 21-3456-R	34,56	303-315	ttttgtgtccatgcacc gtgtagtgttcgcccaa
21-3461-F 21-3461-R	34,61	230-238	aacgccctttgtgatgaa ggagtcagaggttgagcgt
21-3470-F 21-3470-R	34,70	150-160	tcaaatcacacacacgcg gcagaagaatgccagctc

Tab. 6.4: Verwendete Marker und ihre Informativität zur UPD(7)mat-Analyse bei dem Patienten M3335 und seinen Eltern. Die Zahlen in den Spalten der Eltern und des Patienten stehen für die unterschiedlichen Allele der einzelnen Marker.

Marker	Lokalisation (Mbp)	M3837 Vater	M3838 Mutter	M3335 Patient	Informativität
D7S493	21,7	3	1-2	2-3	Biparentale Vererbung
D7S526	30,9	2-3	1-4	3-4	Biparentale Vererbung
D7S2469	41,1	1-4	2-3	1-2	Biparentale Vererbung
D7S2422	51,1	2-3	1-4	3-4	Biparentale Vererbung
D7S2429	62,2	1-2	3-4	4	1 maternales Allel
D7S663	66,4	1-2	2-3	3	1 maternales Allel
D7S630	88,3	1-2	3-4	3	1 maternales Allel
D7S657	92,3	1-4	2-3	3	1 maternales Allel
D7S792	103,3	2-3	1-4	4	1 maternales Allel
D7S501	106,2	1-2	1-3	3	1 maternales Allel
D7S523	111,5	1-2	1-3	3	1 maternales Allel
MEST MS-PCR	129,9				Maternale UPD
D7S636	150,3	1-3	1-2	1	Nicht informativ
D7S1540	150,7				Nicht informativ
D7S483	151,8	2	1-2	2	Nicht informativ

Tab. 6.5: Auflistung der verwendeten Marker und Informativität zur UPD(7)mat-Analyse bei dem Patienten SR85K und seinen Eltern. Die Zahlen in den Spalten der Eltern und des Patienten stehen für die unterschiedlichen Allele der einzelnen Marker.

Marker	Lokalisation (Mbp)	SR85V Vater	SR85M Mutter	SR85K Patient	Informativität
D7S493	21,7 Mb	2-3	1-4	1-3	Biparentale Vererbung
D7S529	25,4 Mb	2-3	1-2	1-3	Biparentale Vererbung
D7S2469	41,1 Mb	2-3	1-4	2-4	Biparentale Vererbung
D7S2422	51,1 Mb	2-4	1-3	1-2	Biparentale Vererbung
D7S2429	62,2 Mb	1-3	2-4	3-4	Biparentale Vererbung
D7S663	66,4 Mb	1-2	2-3	3	1 maternales Allel
D7S630	88,3 Mb	2-3	1-3	1	1 maternales Allel
D7S657	92,3 Mb	1-2	1-3	3	1 maternales Allel
D7S618	96,8 Mb	1-3	2	2	1 maternales Allel
D7S792	103,3 Mb	2-4	1-3	1	1 maternales Allel
D7S2446	103,8 Mb	2-3	1-4	4	1 maternales Allel
D7S501	106,2 Mb	3-4	1-2	1	1 maternales Allel
D7S523	111,5 Mb	1	2	2	1 maternales Allel
NUR	116,8 Mb	3	1-2	2	1 maternales Allel
MEST MS-PCR	129,9 Mb				Maternale UPD
D7S2452	133,1 Mb	1-4	2-3	2	1 maternales Allel
D7S636	150,3 Mb	1-4	2-3	2	1 maternales Allel
D7S483	151,8 Mb	1-2	2-3	2	Nicht informativ

Tab. 6.6: Primer zur Durchführung der MS-PCR für die UPD(7)mat-Diagnostik (Moore et al., 2003)

Primerbezeichnung	Lokalisation	Produktgröße (bp) Pat/Mat	Primersequenz (5'→3')	Verwendetes PCR-System / T _A
UPD7-MMF (maternal methyliertes Allel) UPD7-PUF (paternal unmetyliertes Allel) UPD7-R (gemeinsamer R-Primer)	7q32 <i>PEG1/MEST</i> -Promotor-Region	104/187	tggttggtgggtttgtggtgtttggt gggtgtagttgttcggcgcg ttccaccrcacactcacct	Ampli Taq [®] Polymerase, Applied Biosystems / 63°C

Tab. 6.7: Primer zur Durchführung der MS-PCR für die chromosomalen Regionen 6q24 und 14q32 (Mackay et al., 2005; Temple et al., 2007)

Primer-bezeichnung	Lokali-sation	Produkt-größe (bp) Met/Unmet	Primersequenz (5'→3')	Verwendetes PCR-System / T _A
MS-PCR6-F (gemeinsamer Primer) MS-PCR6-RM (maternal methyliertes Allel) MS-PCR6-RU (paternal un- methyliertes Allel)	6q24	175/188	cacracatctaccattttatcattcaacc ttcggggaagcgtttcgcgcgtaaggtt ggttatgatgggtgatttggggaagtgtttg	Hot Star <i>Taq</i> - DNA Polymerase, Qiagen / 60°C
GTL2B-fam (gemeinsamer Primerl) GTL2b-met (paternal methyliertes Allel) GTL2b-unmet (maternal un- methyliertes Allel)	14q32	193/221	ctccaacaacaaaacccaaaatcaaaca actctc gtgtagatggtagagtagagaggag tgt cgcgttttggttcgttggtttggcggcg	Hot Star <i>Taq</i> - DNA Polymerase, Qiagen / 60°C

Tab. 6.8: Primer-Angaben zur Durchführung der Bisulphit-Sequenzierung der ICR1 in 11p15

Primer-bezeichnung	Lokalisation	Produktgröße (bp) Pat/Mat	Primersequenz (5'→3')	Verwendetes PCR-System / T _A
CTCF-3-F CTCF-3-R	<i>H19</i> -DMR CTCF- Bindestelle 3	892	gggggtagtgagggatag caaacaccattgatcccat	Hot Star <i>Taq</i> - DNA Polymerase, Qiagen / 56°C
CTCF-3-R diente nach der Kolonie-PCR zur Sequenzierung				

Tab. 6.9: Verwendete Primer für *H19* zur Klonierung in pcDNATM5/FRT/TO und zur Sequenzierung der cDNA zur Slicing-Analyse

Primer-bezeichnung	Verwendung	Primersequenz (5'→3')	Produkt-größe (bp)	Verwendetes PCR-System / T _A
H19-FBamHI H19-RNotI	Erzeugung des Inserts	ggatccagagacgtgtgctggaactgtcca gcggccgcggattccagagtctctcgagacaaa	5137 (gDNA)	AccuPrime TM Taq, Invitrogen / 51°C
H19-1.7F/2 H19-TaqR	Splicing-Analyse	agtgaatgagctctcaggag tgtgtccggattcaaaggcc	454 (cDNA)	Taq DNA Polymerase, Qiagen / 57°C
H19-1.1-F2 H19-5.2-R	Splicing-Analyse/ TOPO-TA-Klonierung	aaggagcaccttggacatct ttgccaaggtggctcacact	1980 (cDNA)	AccuPrime TM Taq, Invitrogen / 57°C
H19-1.1-F2	Sequenzierung	aaggagcaccttggacatct	-	-
H19-5.2-R	Sequenzierung	ttgccaaggtggctcacact	-	-
H19-TaqR2	Sequenzierung	cgattcctgagtcaggtagt	-	-

Tab. 6.10: Verwendete Primer für *CTCF* zur Klonierung in pTargetTM und zur Kontroll-Sequenzierung der Klone

Primer-bezeichnung	Verwendung	Primersequenz (5'→3')	Produkt-größe (bp)	Verwendetes PCR-System / T _A
CTCF-5'UTR-F CTCF-3'UTR-R	Erzeugung des Inserts	gccacatggaaggtgatgcagtcga ccgccatcaccgggtccatcatgctga	2190	AccuPrime TM Taq, Invitrogen / 57°C
CTCF-Seq-1F	Sequenzierung des Inserts	gcccataaacataggagaac	-	-
CTCF-Seq-2F	Sequenzierung des Inserts	cgtcgttacaacacaccca	-	-
CTCF-Seq-3F	Sequenzierung des Inserts	ctgataattgtgctggccca	-	-

Tab. 6.11: Primerangaben zur quantitativen Real-Time PCR für die Expressionsanalyse auf cDNA-Ebene

Primer-bezeichnung	Verwendung	Primersequenz (5'→3')	Herkunft
Hs_KCNQ1_1_SG	Expressionsanalyse	-	QuantiTect® Primer Assay (Qiagen)
Hs_TBP_1_SG	Referenzgen/ Haushaltsgen	-	QuantiTect® Primer Assay (Qiagen)
Hs_GRB10_1_SG	Expressionsanalyse	-	QuantiTect® Primer Assay (Qiagen)
Hs_MEST_1_SG	Expressionsanalyse	-	QuantiTect® Primer Assay (Qiagen)
Hs_MYC_1_SG	Positiv-Expressions- kontrolle	-	QuantiTect® Primer Assay (Qiagen)
CTCF-TM-4/5-F CTCF-TM-5-R	Expressionsanalyse	taacacacacacaggtactc aatcgcatggaacacttg	MWG

Tab. 6.12: Benötigte Primer zur Durchführung des ACT-Assays

Primer-bezeichnung	Lokalisation	Primersequenz (5'→3')	Verwendetes PCR-System / T _A
<i>H19</i> -SpezPrimer-1F	CTCF-Bindestelle 6 <i>H19</i> -DMR	cggcagtgcaggctcacacatcaca	Hot Star <i>Taq</i> -DNA Polymerase, Qiagen / 58°C
<i>H19</i> -SpezPrimer-1R		tgtgatgtgtgagcctgcactgccg	
<i>H19</i> -SpezPrimer-2F		gtggaaacgtcccgggtcacccaag	
<i>H19</i> -SpezPrimer-2R		caacaattccgtgccatccaggcg	
ACT- <i>GRB10</i> -1F	maternal methylierte CpG-Insel 2 von <i>GRB10</i> in 7p12-p11.2	tgcaatactcagcctccgag	
ACT- <i>GRB10</i> -1R		ctcggaggctgagtattgca	
ACT- <i>GRB10</i> -2F		tccttggttctcatggcaac	
ACT- <i>GRB10</i> -2R		ttggcccgctttctgtgcta	
ACT- <i>MEST</i> -1F	maternal methylierte Promotor-Region von <i>MEST</i> in 7q32	ccgtggccttaactcatcag	
ACT- <i>MEST</i> -1R		ctgatgagttaaggccacgg	
ACT- <i>MEST</i> -2F		tcagggttggcggttaacga	
ACT- <i>MEST</i> -2R		tcgaagcgtgggtactgaac	

7. Literaturliste

7.1 In der Arbeit zitierte Publikationen

Algar E, Brickell S, Deeble G, Amor D, Smith P. Analysis of CDKN1C in Beckwith Wiedemann syndrome. *Hum Mutat* 2000; **15**: 497-508

Beck S, Berlin K, Eckardt F. Das Epigenomprojekt. *Medgen* 2005; **17**: 265-269

Binder G, Mavridou K, Wollmann HA, Eggermann T, Ranke MB. Screening for insulin-like growth factor-I receptor mutations in patients with Silver-Russell syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002; **15**: 1167-1171

Blagitko N, Schulz U, Schinzel AA, Ropers HH, Kalscheuer VM. *Gamma2-COP*, a novel imprinted gene on chromosome 7q32, defines a new imprinting cluster in the human genome. *Hum Mol Genet* 1999; **8**: 2387-2396

Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, Tilghman SM. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 28-36

Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Esenberg AJ, Allen RC. Analysis of the VNTR locus D1S80 by PCR followed by high-resolution PAGE. *Am Hum Genet* 1991; **9**: 1587-1595

Bullman H, Lever M, Robinson DO, Mackay DJ, Holder SE, Wakeling EL. Mosaic maternal uniparental disomy of chromosome 11 in a patient with Silver-Russell syndrome. *J Med Genet* 2008; **45**: 396-399

Cai X, Cullen BR. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA* 2007; **13**: 313-316

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**: 8292-8297

Cooper WN, Luharia A, Evans GA, Raza H, Haire AC, Grundy R, Bowdin SC, Riccio A, Sebastio G, Bliet J, Schofield PN, Reik W, Macdonald F, Maher ER. Molecular subtypes and phenotypic expression of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2005; **13**: 1025-1032

DeBaun MR, Niemitz , McNeil DE, Brandenburg SA, Lee MP, Feinberg AP. Epigenetic alterations of H19 and LIT1 distinguish patients with Beckwith-Wiedemann syndrome with cancer and birth defects. *Am J Hum Genet* 2002; **109**: 604-611

Dörr S, Midro AT, Färber C, Giannakudis J, Hansmann I. Construction of a detailed physical and transcript map of the candidate region for Russell-Silver syndrome on chromosome 17q23-q24. *Genomics* 2001; **71**: 174-181

Dupont JM, Cuisset L, Le Tessier D, Vasseur C, Rabinea, Jeanpierre M. Familial reciprocal translocation t(7;16) associated with maternal uniparental disomy 7 in a Silver-Russell patient. *Am J Med Genet* 2002; **111**: 405-408

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**: 415-419

Eggermann T, Meyer E, Obermann C, Heil I, Schüler HM, Ranke MB, Eggermann K, Wollmann HA. Is maternal duplication of 11p15 associated with Silver-Russell syndrome? *J Med Genet* 2005; **42**: e26

Eggermann T, Schönherr N, Meyer E, Obermann C, Mavany M, Eggermann K, Ranke MB, Wollmann HA. Epigenetic mutations in 11p15 in Silver-Russell syndrome are restricted to the telomeric imprinting domain. *J Med Genet* 2006; **43**: 614-615

Eggermann T, Schönherr N, Eggermann K, Wollmann H A. Hypomethylation in the 11p15 telomeric imprinting domain in a patient with Silver-Russell syndrome with a CSH1 deletion (17q24) renders a functional role of this alteration unlikely. *J Med Genet* 2007; **44**: e77

Eggermann T, Eggermann K, Schönherr N. Growth retardation versus overgrowth: Silver-Russell syndrome is genetically opposite to Beckwith-Wiedemann syndrome. *Trends Genet* 2008a; **24**: 195-204

Eggermann T, Meyer E, Caglayan A O, Dundar M, Schönherr N. ICR1 epimutations in 11p15 are restricted to patients with Silver-Russell syndrome features. *J Ped End Met* 2008b; **21**: 59-62

Eggermann T, Schönherr N, Eggermann K, Wollmann H A. Use of multiplex ligation-dependent probe amplification increases the detection rate for 11p15 epigenetic alterations in Silver-Russell syndrome. *Clin Genet* 2008c; **73**: 79-84

Eggermann T, Schönherr N, Jäger S, Spaich C, Ranke M, Wollmann H, Binder G. Segmental maternal UPD(7q) in Silver-Russell syndrome. *Clin Genet* 2008d; **74**: 486-489

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. *J Ped*, eingereicht

Falkert A, Dittmann K, Seelbach-Göbel B. Silver-Russell syndrome as a cause for early intrauterine growth restriction. *Prenat Diagn* 2005; **25**: 497-501

Filippova GN, Fagerlie S, Klenova EM, Myers C, Dehner Y, Goodwin G, Neiman PE, Collins SJ, Lobanenko VV. An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 2802-2813

Fisher A, Thomas NS, Cockwell A, Stecko O, Kerr B, Temple IK, Clayton P. Duplications of chromosome 11p15 of maternal origin result in a phenotype that includes growth retardation. *Hum Genet* 2002; **111**: 290-296

Fitzpatrick GV, Soloway PD, Higgins MJ. Regional loss of imprinting and growth deficiency in mice with a targeted deletion of KvDMR. *Nat Genet* 2002; **32**: 426-431

Gicquel C, Rossignol S, Cabrol S, Hoang M, Steunou V, Barbu V, Danton F, Thibaud N, Le Merrer M, Burglen L, Bertrand A-M, Netchine I, Le Bouc Y. Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat Genet* 2005; **37**: 1003-1007

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**: 247-253

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

Jeong S, Pfeifer K. Shifting insulator boundaries. *Nat Genet* 2004; **36**: 1036-1037

Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factor and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995; **16**: 3-34

Jones BK, Levorse JM, Tilghman SM. Igf2 imprinting does not require its own DNA methylation or H19 RNA. *Genes Dev*; **12**: 2200-2207

Kagami M, Nagai T, Fukami M, Yamazawa K, Ogata T. Silver-Russell syndrome in a girl born after in vitro fertilization: partial hypermethylation at the differentially methylated region of PEG1/MEST. *J Assist Reprod Genet* 2007; **24**: 131-136

Kagami M, Sekita Y, Nishimura G, Irie M, Kato F, Okada M, Yamamori S, Kishimoto H, Nakayama M, Tanaka Y, Matsuoka K, Takahashi T, Noguchi M, Tanaka Y, Masumoto K, Utsunomiya T, Kouzan H, Komatsu Y, Ohashi H, Kurosawa K, Kosaki K, Ferguson-Smith AC, Ishino F, Ogata T. Deletions and epimutations affecting the human 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes. *Nat Genet* 2008; **40**: 237-242

Kim M, Li D, Cui Y, Mueller K, Cheers WC, DeJong J. Regulatory factor interactions and somatic silencing of the germ cell-specific ALF gene. *J Biol Chem* 2006; **281**: 34288-34298

Kosaki L, Kikuchi T, Yoshihashi H. Russell-Silver syndrome as a phenotype resulting from defects in the IGF1R axis: the ligand IGF2, its receptor IGF1R, or the signaling modulator GRB10. *Am J Hum Genet* 2000; **67S**: 1932

Kotzot D, Schmitt S, Bernasconi F, Robinson WP, Lurie IW, Ilyina H, Méhes K, Hamel BCJ, Otten BJ, Hergersberg M, Weder E, Schoenle E, Schinzel A. Uniparentale disomy 7 in Silver-Russell syndrome and primordial growth retardation. *Hum Mol Genet* 1995; **4**: 583-587

Kotzot D, Balmer D, Baumer A, Chranowska K, Hamel BCJ, 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**: 247-256

Kotzot D, Utermann G. Uniparental disomy (UPD) other than 15: phenotypes and bibliography updated. *Am J Med Genet A* 2005; **136**: 287-305

Mackay DJ, Temple IK, Shield JP, Robinson DO. Bisulphite sequencing of the transient neonatal diabetes mellitus DMR facilitates a novel diagnostic test but reveals no methylation anomalies in patients of unknown aetiology. *Hum Genet.* 2005; **116**: 255-261

Kurukuti S, Tiwari VK, Tavoosidana G, Pugacheva E, Murrell A, Zhao Z, Lobanenko V, Reik W, Ohlsson R. CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 10684-10689

Lee MH, Reynisdóttir I, Massagué J. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 1995; **9**: 639-649

Mackay DJ, Boonen SE, Clayton-Smith J, Goodship J, Hahnemann JM, Kant SG, Njølstad PR, Robin NH, Robinson DO, Siebert R, Shield JP, White HE, Temple IK. A maternal hypomethylation syndrome presenting as transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Genet.* 2006; **120**: 262-269

Ling JQ, Li T, Hu JF, Vu TH, Chen HL, Qiu XW, Cherry AM, Hoffman AR. CTCF mediates interchromosomal colocalization between Igf2/H19 and Wsb1/Nf1. *Science* 2006; **312**: 269-272

Maher ER, Brueton LA, Bowdin SC, Luharia A, Cooper W, Cole TR, Macdonald F, Sampson JR, Barratt CL, Reik W, Hawkins MM. Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J Med Genet.* 2003; **40**: 62-64

Maher ER and Reik W. Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited. *J Clin Invest* 2000; **105**: 247-252

Monk D, Wakeling EL, Proud V, Hitchins M, Abu-Amero SN, Stanier P, Preece MA, Moore GE. Duplication of 7p11.2-p13, including *GRB10*, in Silver-Russell syndrome. *Am J Med Genet* 2000; **66**: 36-46

Monk D, Bentley L, Hitchins M, Myler RA, Clayton-Smith J, Ismail S, Price SM, Preece MA, Stanier P, Moore GE. Chromosome 7p disruption in Silver-Russell syndrome: delineating an imprinted candidate gene region. *Hum Genet* 2002; **111**: 376-387

Moore MW, Dietz LG, Tirtorahardjo B, Cotter PD. A multiplex methylation PCR assay for identification of uniparental disomy of chromosome 7. *Hum Mutat.* 2003; **21**: 645-648

Nakabayashi K, Fernandez BA, Teshima I, Shuman C, Proud VK, Curry CJ, Chitayat D, Grebe T, Ming J, Oshimura M, Meguro M, Mitsuya K, Deb-Rinker P, Herbrick JA, Weksberg R, Scherer SW. Molecular genetic studies of human chromosome 7 in Silver-Russell syndrome. *Genomics* 2002; **79-2**: 186-196

Neitzel H. A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum Genet* 1986; **73**: 320-326

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**: 3148-3154

Niemitz EL, DeBaun MR, Fallon J, Murakami K, Kugoh H, Oshimura M, Feinberg AP. Microdeletion of LIT1 in familial Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Hum Genet.* 2004; **75**: 844-849

Obermann C, Meyer E, Prager S, Tomiuk J, Wollmann HA, Eggermann T. Searching for genomic variants in IGF2 and CDKN1C in Silver-Russell syndrome patients. *Mol Genet Metabol* 2004; **82**: 246-250

Ørstavik KH, Eiklid K, van der Hagen CB, Spetalen S, Kierulf K, Skjeldal O, Buiting K. Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. *Am J Hum Genet.* 2003; **72**: 218-219

Preece MA, Abu-Amero SN, Ali Z, Abu-Amero KK, Wakeling EL, Stanier P, Moore GE. An analysis of the distribution of hetero- and isodisomic regions of chromosome 7 in 5 matUPD7 Silver-Russell syndrome probands. *J Med Genet* 1999; **36**: 457-460

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**: 837-842

Reboul MP, Tandonnet O, Biteau N et al. Mosaic uniparental isodisomy for chromosome 7q21-qter. *Am J Med Genet* 2006; **70**: 207-213

Riesewijk AM, Blagitko N, Schinzel AA; Hu L, Schulz U, Hamel BC, Ropers HH, Kalscheuer VM. Evidence against a major role of *PEG1/MEST* in Silver-Russell syndrome. *Eur J Hum Genet* 1998; **8**: 2387-2396

Robinson WP, Slee J, Smith N, Murch A, Watson SK, Lam WL, McFadden DE. Placental mesenchymal dysplasia associated with fetal overgrowth and mosaic deletion of the maternal copy of 11p15.5. *Am J Med Genet A.* 2007; **143A**: 1752-1759

Rossignol S, Steunou V, Chalas C, Kerjean A, Rigolet M, Viegas-Pequignot E, Jouannet P, Le Bouc Y, Gicquel C. 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**: 1040-1044

Schönherr N. Bedeutung genomischer Veränderungen der Region 11p15 beim Silver-Russell-Syndrom und verwandten Kleinwuchs-Formen. Diplomarbeit Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn 2005

Schönherr N, Meyer E, Eggermann K, Ranke M B, Wollmann H A. (Epi)mutations in 11p15 significantly contribute to Silver-Russell syndrome: but are they generally involved in growth retardation? *Eur J Med Genet* 2006; **49**: 414-418

Schönherr N, Meyer E, Roos A, Schmidt A, Wollmann H A, Eggermann T. The centromeric 11p15 imprinting center is also involved in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet* 2007a; **44**: 59-63

Schönherr N, Meyer E, Binder G, Wollmann H A, Eggermann T. No evidence for additional imprinting defects in Silver-Russell syndrome patients with uniparental disomy 7 or 11p15 epimutation. *J Ped End Met* 2007b; **20**: 1329-1331

Schönherr N, Binder G, Korsch E, Kämmerer E, Wollmann H A, Eggermann T. Are H19 variants associated with Silver-Russell syndrome? *J Ped End Met* 2008; **21**: 985-993

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**: 909-916

Silver HK, Kiyansu W, George J, Deamer WC. Syndrome of congenital hemihypertrophy, shortness of stature, and elevated urinary gonadotrophins. *Pediatrics* 1953; **12**: 368-376

Smilnich NJ, Day CD, Fitzpatrick GV, Caldwell GM, Lossie AC, Cooper PR, Smallwood AC, Joyce JA, Schofield PN, Reik W, Nicholls RD, Weksberg R, Driscoll DJ, Maher ER, Shows TB, Higgins MJ. A maternally methylated CpG island in KvLQT1 is associated with an antisense paternal transcript and loss of imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 8064-8069

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**: 958-960

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

Svensson J, Björnsthål A, Ivarsson SA. Increased risk of Silver-Russell syndrome after in vitro fertilization? *Acta Paediatr.* 2005; **94**: 1163-1165

Temple IK, Shrubbs V, Lever M, Bullman H, Mackay DJ. Isolated imprinting mutation of the DLK1/GTL2 locus associated with a clinical presentation of maternal uniparental disomy of chromosome 14. *J Med Genet.* 2007; **44**: 637-640

Vianna-Morgante AM, Bonaldi A, Honjo RS, Bertola DR, Albano LMJ, Furquim IM, Kim CA, Mazzeu JF. Duplication restricted to ICR2 (*KCNQ1*, *KCNQ1OT1* and *CDKN1C* genes) at 11p15 segregation in a family with five children affected by Silver-Russell syndrome. *ASHG* 2008; **58**: 836/W (Poster)

Wagschal A, Feil R. Genomic imprinting in the placenta. *Cytogenet Genome Res.* 2006; **113**: 90-98

Weksberg R, Smith AC, Squire J, Sadowski P. Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrate a role for epigenetic control of normal development. *Hum Mol Gene* 2003; **12**: R61-R68

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**: 958-968

Yamazawa K, Kagami M, Fukami M, Matsubara K, Ogata T. Monozygotic female twins discordant for Silver-Russell syndrome and hypomethylation of the H19-DMR. *J Hum Genet.* 2008; **53**: 950-955

7.2 Eigene Publikationen

Originalarbeiten:

Eggermann T, Schönherr N, Meyer E, Obermann C, Mavany M, Eggermann K, Ranke MB, Wollmann HA. Epigenetic mutations in 11p15 in Silver-Russell syndrome are restricted to the telomeric imprinting domain. *J Med Genet* 2006; **43**: 614-615

Eggermann T, Schönherr N, Meyer E, Mavany M, Eggermann K, Wollmann H A. Silver-Russell-Syndrom und Beckwith-Wiedemann-Syndrom: Zwei klinisch gegensätzliche Syndrome der gleichen genetischen Region. *Medgen* 2006; **18**: 254-259

Schönherr N, Meyer E, Eggermann K, Ranke M B, Wollmann H A. (Epi)mutations in 11p15 significantly contribute to Silver-Russell syndrome: but are they generally involved in growth retardation? *Eur J Med Genet* 2006; **49**: 414-418

Eggermann T, Schönherr N, Meyer E, Eggermann K, Zerres K, Wollmann H A. Genetics of Silver-Russell syndrome. *J Med Genet* 2006; **43**: S41-S41

Schönherr N, Meyer E, Roos A, Schmidt A, Wollmann H A, Eggermann T. The centromeric 11p15 imprinting center is also involved in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet* 2007a; **44**: 59-63

Eggermann T, Schönherr N, Eggermann K, Wollmann H A. Hypomethylation in the 11p15 telomeric imprinting domain in a patient with Silver-Russell syndrome with a CSH1 deletion (17q24) renders a functional role of this alteration unlikely. *J Med Genet* 2007; **44**e77

Eggermann T, Meyer E, Schönherr N, Flick F, Chauvistre H, Mavany M, Wollmann H A. Mutation analysis of GNAS1 and overlapping transcripts in Silver-Russell syndrome patients. *Mol Genet Metab* 2007; **90**: 224-226

Schönherr N, Meyer E, Binder G, Wollmann H A, Eggermann T. No evidence for additional imprinting defects in Silver-Russell syndrome patients with uniparental disomy 7 or 11p15 epimutation. *J Ped End Met* 2007b; **20**: 1329-1331

Eggermann T, Schönherr N, Eggermann K, Wollmann H A. Use of multiplex ligation-dependent probe amplification increases the detection rate for 11p15 epigenetic alterations in Silver-Russell syndrome. *Clin Genet* 2008c; **73**: 79-84

Eggermann K, Schönherr N, Ranke M B, Wollmann H A, Binder G, Eggermann T. Search for subtelomeric imbalances by multiplex ligation-dependent probe amplification in Silver-Russell syndrome. *Genet Test* 2008; **12**: 111-113

Eggermann T, Eggermann K, Schönherr N. Growth retardation versus overgrowth: Silver-Russell syndrome is genetically opposite to Beckwith-Wiedemann syndrome. *Trends Genet* 2008a; **24**: 195-204

Eggermann T, Meyer E, Caglayan A O, Dundar M, Schönherr N. ICR1 epimutations in 11p15 are restricted to patients with Silver-Russell syndrome features. *J Ped End Met* 2008b; **21**: 59-62

Roos A, Elbracht M, Baudis M, Senderek J, Schönherr N, Eggermann T, Schüler H M. A10.7 Mb interstitial deletion of 13q21 without phenotypic effect defines a further non-pathogenic eucromatic variant. *Am J Med Genet A* 2008; **146A**: 2417-2420.

Eggermann T, Schönherr N, Jäger S, Spaich C, Ranke M, Wollmann H, Binder G. Segmental maternal UPD(7q) in Silver-Russell syndrome. *Clin Genet* 2008d; **74**: 486-489

Schönherr N, Binder G, Korsch E, Kämmerer E, Wollmann H A, Eggermann T. Are H19 variants associated with Silver-Russell syndrome? *J Ped End Met* 2008; **21**: 985-993

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. *J Ped*, eingereicht

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 harbour Silver-Russell specific variants. *J Ped End Met*; im Druck

Zitierbare Abstracts:

Eggermann K, Meyer E, Schönherr N, Obermann C, Wollmann HA, Eggermann T. Maternal duplications in 11p15 are associated with intrauterine and postnatal growth retardation. *Chrom Res* 2005; **13S1**: 15.3P

Schönherr N, Meyer E, Eggermann K, Wollmann HA, Eggermann T. Role of (epi)mutations in 11p15 in Silver-Russell syndrome like patients and related growth retardation phenotypes. *Medgen* 2006; **18**: P232 (Poster)

Eggermann T, Meyer E, Schönherr N, Mavany M, Eggermann K, Wollmann HA. Silver-Russell and Beckwith-Wiedemann syndrome: two opposite (epi)genetic disturbances of the same chromosomal region. *Medgen* 2006; **18**: W505 (Vortrag)

Meyer E, Schönherr N, Korsch E, Wollmann HA, Eggermann T. Haplotype analyses in two Silver-Russell syndrome families consistent with the inheritance of epimutations in 11p15. *Medgen* 2006; 18: P234 (Poster)

Schönherr N, Meyer E, Wollmann HA, Eggermann T, 2007: No demethylation of further loci in Silver-Russell syndrome patients with maternal uniparental disomy 7 or 11p15 epimutation. *Medgen* 19: P230 (Poster)

Eggermann T, Meyer E, Binder G, Ranke MB, Wollmann HA, Schönherr N. ICR1 epimutations in 11p15 are restricted to patients with Silver-Russell syndrome features. *Medgen* 2007; 19: P234 (Poster)

Schwanitz G, Hansmann D, Gamberdinger U, Paetzold U, Schönherr N, Köpfle G, Eggermann T. Mosaicism of a duplication 1q due to de-novo translocation 1/14: Studies on origin and development of the pathologic cell line. *ASHG* 2007; 57: 1598/W (Poster)

Schönherr N, Binder G, Korsch E, Wollmann HA, Eggermann T. Are H19 mutations involved in Silver-Russell syndrome? *ASHG* 2007; 57: 704/T (Poster)

Eggermann T, Schönherr N, Jäger S, Eggermann K, Spaich C, Wollmann HA, Binder G. Diagnostic algorithm in Silver-Russell syndrome: Update and „rare“ findings. *Medgen* 2008; 20: P172 (Poster)

Eggermann K, Baudis M, Schönherr N, Zerres K, Ensenaer R, Eggermann T. New 2p21 deletion in hypotonia-cystinuria syndrome. *Medgen* 2008; 20: P169 (Poster)

Jäger S, Schönherr N, Wollmann HA, Binder G, Eggermann T. Search for mutations in the *PLAGL1/ZAC1* gene om Silver-Russell syndrome patients. *Medgen* 2008; 20: P171 (Poster)

Gonzales D, Eggermann T, Schönherr N, Schmidtke J, Arslan-Kirschner M. Silver-Russell-Syndrome: A follow-up case report. *Medgen* 2008; 20: P010 (Poster)

Schüler HM, Elbracht M, Baudis M, Senderek J, Schönherr N, Eggermann T, Roos A. A 10,9 Mb interstitial deletion of chromosome 13q without phenotypic effect. *Medgen* 2008; 20: P083 (Poster)

Schönherr N, Spengler S, Gonzalez D, Arslan-Kirchner M, Binder G, Eggermann T. Broad clinical spectrum in Silver-Russell syndrome and consequences for genetic testing. *ASHG* 2008; **58**: 301/W (Poster)

Eigene Vorträge:

Schönherr N, 2007: Patienten mit Silver-Russell-Syndrom und segmentaler Uniparentaler Disomie 7. Symposium „Epigenetik“ am 05.09.2007, Aachen

Schönherr N, 2008: „Herkömmliche“ Nachweisverfahren epigenetischer Veränderungen/ Methylierungsspezifische MLPA. Treffen der „Medizinischen Genetik Nordrhein“, April 2008, Köln

Danksagung

Ich möchte mich bedanken bei...

... Herrn Prof. Dr. T. Eggermann für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, die engagierte Betreuung sowie für die dauerhafte und wertvolle Unterstützung, sowohl bei der Durchführung der praktischen Arbeit, als auch bei der Förderung und Ermöglichung meiner beruflichen Weiterbildung.

... Herrn Prof. Dr. J. Bohrmann, Institut für Biologie II der RWTH Aachen, für die freundliche und engagierte Übernahme des Koreferats.

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

... der Sektion der Pädiatrischen Endokrinologie der Universitäts-Kinderklinik Tübingen für die Kooperation bei der Zusammenstellung des Patientenkollektivs, vor allem aber bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. med. H.A. Wollmann und Prof. Dr. G. Binder für die Erfassung der klinischen Daten.

... den SRS-Patienten und 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 die gute Atmosphäre beim Arbeiten sowie für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei Problemen und Fragen, insbesondere Frau Dipl. Biol. V. Frank, Herrn Dipl. Biol. A. Roos und Frau TÄ N. Ortiz Brühle.

... meinen Freunden und engsten Vertrauten, die mich nie im Stich lassen.

... meinen Eltern Walter und Marlies Schönherr für die Ermöglichung meines Studiums sowie für ihre uneingeschränkte Unterstützung und unendliche Geduld in allen Lebenslagen.

Danksagung

... meiner Schwester Caroline Schönherr dafür, dass sie bedingungslos für mich da ist und immer einen Weg findet mich aufzumuntern.

... meinem Partner Thomas Bachmann, der mich zu jeder Zeit liebevoll und bedingungslos unterstützt hat und dessen Geduld scheinbar unerschöpflich ist.

Curriculum Vitae

Name: Nadine Schönherr
Anschrift: Boxgraben 110, 52064 Aachen
Geburtsdatum: 22.06.1981
Geburtsort: Troisdorf
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulausbildung:

1987-1991 Katholische Grundschule Geistingen, Hennef (Sieg)
1991-2000 Erzbischöfliches Sankt-Adelheid-Gymnasium, Bonn
2000 Abitur am Sankt-Adelheid-Gymnasium, Bonn

Studium:

Nov 2005 – Okt 2008 Förderung der Promotion durch ein Graduierten-Stipendium der RWTH Aachen
Nov 2005 Beginn der Promotion am Institut für Humangenetik der RWTH Aachen mit dem Thema „Untersuchung zu (epi)genetischen Veränderungen auf Chromosom 11p15 und ihre funktionelle Relevanz bei Patienten mit Silver-Russell-Syndrom“ (Betreuer: Prof. Dr. T. Eggermann)
Feb 2005 – Nov 2005 Diplomarbeit am Institut für Humangenetik der RWTH Aachen mit dem Thema „Bedeutung genomischer Veränderungen der Region 11p15 beim Silver-Russell-Syndrom und verwandten Kleinwuchs-Formen“ (Betreuer: Prof. Dr. T. Eggermann)
Abschluss: Diplombiologin
Okt 2000 – Nov 2005 Absolvierung des Diplomstudienganges Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn mit der Abschlussnote: 1,0

Berufstätigkeit:

Nov 2005 – Okt 2008 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Humangenetik der RWTH Aachen zur Promotion
seit Nov 2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Humangenetik der RWTH Aachen zur Promotion

Berufliche Weiterbildung:

März 2008 Aktive Teilnahme an der 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik in Hannover
März 2007 Aktive Teilnahme an der 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik in Bonn
März 2006 Aktive Teilnahme an der 17. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik in Heidelberg
2005-2008 halbjährliches Arbeitstreffen der Klinischen Genetik Nordrhein (Düsseldorf, Essen, Aachen, Bonn, Köln)