

Aus dem Institut für Humangenetik
(Direktor: Prof. Dr. med. Reiner Siebert)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**ASSOZIATION VON STÖRUNGEN DER DNA-METHYLIERUNG
AN GENORTEN, DIE DEM IMPRINTING UNTERLIEGEN, MIT
„SMALL FOR GESTATIONAL AGE“-GEBURTlichkeit**

Inguinaldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
JUDITH LEOHOLD

aus Hannover

Kiel 2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Reiner Siebert (Institut für Humangenetik)
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Hampe (Institut für Innere Medizin I)

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2013

Zum Druck genehmigt, Kiel den 13.11.2014

gez. Prof. Dr. Johann Roider
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Small for Gestational Age (SGA): Definition, Ursachen, Auswirkungen	1
1.2 Genomisches Imprinting	2
1.3 SGA als Phänotyp von Imprintingstörungen	4
1.4 Imprintingsyndrome.....	4
1.4.1 Prader-Willi-Syndrom (PWS) und Angelman-Syndrom (AS).....	5
1.4.2 Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) und Silver-Russell-Syndrom (SRS).....	7
1.4.3 Temple-Syndrom (TS).....	8
1.4.4 Transienter neonataler Diabetes mellitus (TNDM) und assoziiertes Hypomethylierungssyndrom	9
1.4.5 Übersicht über die hier vorgestellten Imprintingsyndrome	11
1.5 Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit.....	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Untersuchungsmaterial	13
2.1.1 Patientenkollektiv	13
2.1.2 Kontrollkollektiv.....	13
2.2 Materialien.....	14
2.2.1 Reagenzien und Chemikalien	14
2.2.2 Puffer, Lösungen und Gele	15
2.2.3 Kits.....	15
2.2.4 Primer	16
2.2.5 Geräte und Software.....	17
2.3 Methoden	18
2.3.1 DNA-Extraktion und -Quantifizierung.....	18

2.3.1.1	DNA-Extraktion	18
2.3.1.2	DNA-Quantifizierung	19
2.3.2	Bisulfitkonvertierung	19
2.3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	21
2.3.4	Pyrosequenzierung	22
2.3.5	SNP-Array	26
2.4	Auswertung der Bisulfit-Pyrosequenzierung	26
3	Ergebnisse	28
3.1	Vorliegen maternaler Einflussfaktoren innerhalb der SGA-Gruppe	28
3.2	DNA-Methylierungsanalyse bekannter elterlich geprägter Genorte	29
3.2.1	Auswertung der Bisulfit-Pyrosequenzierung	29
3.2.2	Genort DIRAS3 auf Chromosom 1	29
3.2.3	Genort PLAGL1 auf Chromosom 6	31
3.2.4	Genort IGF2R auf Chromosom 6	33
3.2.5	Genort MEST auf Chromosom 7	34
3.2.6	Genorte IGF2 und H19 auf Chromosom 11	36
3.2.7	Genort MEG3 auf Chromosom 14	38
3.2.8	Genorte SNRPN und NDN auf Chromosom 15	41
3.2.9	Genorte NESP und NESPAS auf Chromosom 20	42
3.3	Weiterführende Analyse bei Verdacht auf Temple-Syndrom	44
3.4	Untersuchung der IGF2R Hypermethylierung	45
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	47
4	Diskussion	48
4.1	Methodische Aspekte	48
4.1.1	Wahl der Methoden	48
4.1.1.1	Pyrosequenzierung	48
4.1.1.2	Alternative Methoden	49

4.1.2	Auswahl der Genorte	49
4.1.3	Bewertung der Ergebnisse.....	50
4.1.3.1	Gruppenvergleiche.....	50
4.1.3.2	Individualauswertung der Einzelproben.....	51
4.2	Medizinisch-biologische Aspekte	52
4.2.1	<i>H19_6CTCF</i>	52
4.2.2	<i>IGF2R</i> Hypermethylierung.....	53
4.2.3	Temple-Syndrom.....	54
4.2.3.1	Klinischer Vergleich der Patientin Klru280204 mit dem Phänotyp des TS.....	55
4.2.4	Andere Ursachen der SGA-Geburtlichkeit.....	56
4.3	Fazit/Ausblick	58
5	Zusammenfassung	59
6	Literaturverzeichnis	60
7	Anhang.....	66
8	Veröffentlichung.....	78
9	Danksagung	79
10	Lebenslauf	80
11	Erklärung	81

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro- (10^{-6})
A	Adenin (DNA-Base)
Abb.	Abbildung
AS	Angelman-Syndrom
ATP	Adenosintriphosphat
bp	basepair (Basenpaar)
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
C	Cytosin (DNA-Base)
ca.	circa
Chr.	Chromosom
CpG	Cytosin-Guanin Dinukleotid
DMR	Differentiell methylierte Region
DNA	desoxyribonucleid acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNMT	DNA-Methyltransferase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
g	Gramm
G	Guanin (DNA-Base)
IC	Imprinting Center

ICR	Imprinting Control Region
ID	Imprintingdefekt
IG-DMR	Intergenische DMR
<i>IGF2</i>	Insulin-like growth factor II-Gen
<i>IGF2R</i>	IGF2-Rezeptor-Gen
IQ	Intelligenz Quotient
kb	Kilobasen
l	Liter
m	milli- (10^{-3})
M	molar
<i>MEG3</i>	maternally expressed gene 3 (Synonym: <i>GTL2</i>)
<i>MEST</i>	mesoderm specific transcript gene
min	Minute
MK	methylierte Kontrolle
MS-PCR	methylierungsspezifische PCR
MW	Mittelwert
n	nano- (10^{-9})
ncRNA	non-coding ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
<i>NDN</i>	Necdin-homolog (Gen)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
<i>PEG3</i>	paternally expressed 3-Gen
PHP	Pseudohypoparathyreodismus
<i>PLAGL1</i>	pleomorphic adenoma gene like I-Gen

PPi	Pyrophosphat
PWS	Prader-Willi-Syndrom
RNA	ribonucleid acid (Ribonukleinsäure)
SD	Standardabweichung
SGA	Small for gestational age
SNP	Single nucleotide polymorphism
<i>SNRPN</i>	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N-Gen
<i>SNURF</i>	SNRPN upstream reading frame-Gen
SRS	Silver-Russell-Syndrom
T	Thymin (DNA-Base)
Tab.	Tabelle
TNDM	Transienter neonataler Diabetes mellitus
TS	Temple-Syndrom, upd(14)mat-Syndrom
U	Umdrehungen
U	Uracil (DNA-Base)
u. a.	unter anderem
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
UPD	Uniparentale Disomie
upd(14)mat	maternale uniparentale Disomie von Chromosom 14
UV-Licht	Ultra-violettes Licht
V	Volt
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Small for Gestational Age (SGA): Definition, Ursachen, Auswirkungen

SGA (SGA = small for gestational age) geborene Kinder liegen bei der Geburt dem normalen Reifegrad für das Schwangerschaftsalter zurück. Die Definitionen für die SGA-Geburtlichkeit variieren, in der Regel gilt diese als ein Geburtsgewicht und/ oder eine Geburtslänge von mehr als -2 Standardabweichungen (SD) unterhalb des dem Gestationsalter entsprechenden Durchschnitts (Lee et al. 2003). Gelegentlich wird SGA auch als Geburtsmaße unterhalb der 10. Perzentile definiert. Etwa 3-5% aller Neugeborenen fallen in diese Gruppe (Zegher et al. 1998).

Für diese Arbeit wurde SGA-Geburtlichkeit auf ein vermindertes Geburtsgewicht und/ oder -länge von mehr als -2 SD von dem Gestationsalter entsprechenden Mittel definiert. Als Referenzwerte dienten hierfür geschlechtsspezifische Normwerte für die 24. Schwangerschaftswoche bis zum 24. Lebensmonat, die 2008 von Niklasson und Albertsson-Wikland anhand aktueller Daten erhoben wurden (Niklasson & Albertsson-Wikland 2008).

Als Ursache für eine SGA-Geburtlichkeit sind viele Faktoren bekannt. Zum einen sind mütterliche Faktoren und Umweltfaktoren wie eine Schwangerschaftshypertonie, Uterusanomalien, eine Plazentainsuffizienz, Nikotin- und Alkoholabusus, Untergewicht, Mehrlingsschwangerschaften und intrauterine Infektionen mit SGA-Geburtlichkeit assoziiert (Doctor et al. 2001). Zum anderen können genetische Störungen wie chromosomale Aberrationen und Erkrankungen mit einem fehlerhaften genomischen Imprinting, wie z. B. das Silver-Russell-Syndrom (SRS) oder der transiente neonatale Diabetes mellitus (TNDM), mit einer intrauterinen Wachstumsverzögerung einhergehen (siehe 1.4).

Die meisten der SGA-geborenen Kinder zeigen vor allem in den ersten sechs Lebensmonaten ein Aufholwachstum, das spätestens bis zum 3. Lebensjahr abgeschlossen ist, und erreichen so normale Körpermaße (Karlberg & Albertsson-Wikland 1995). Bei 10-15% bleibt hingegen das Aufholwachstum aus und es resultiert ein permanenter Kleinwuchs (Chatelain et al. 2007).

Neben einem erhöhten Risiko für Kleinwüchsigkeit sind SGA-geborene Kinder zudem häufiger mit medizinischen Problemen konfrontiert als Kinder mit normalen Geburtsmaßen. Das Risiko für neonatale Hypothermien und Hypoglykämien ist deutlich erhöht, sodass postnatal eine besonders sorgfältige Überwachung des Neugeborenen indiziert ist (Doctor et al. 2001). Auch in der späteren Entwicklung weisen SGA-geborene Kinder gehäuft neurologische und psychomotorische Defizite auf. Die Prävalenz des metabolischen Syndroms mit erhöhter Insulinresistenz ist bis zu zehnmal höher als bei nicht-SGA-geborenen Kindern (van Dijk et al. 2007; Chatelain et al. 2007).

Für einige SGA-geborene Kinder, die fehlendes Aufholwachstum zeigen, kommt unter bestimmten Voraussetzungen eine Behandlung mit Wachstumshormonen in Frage. Mit der Therapie wird ab dem vierten Lebensjahr begonnen, wenn das Kind weiterhin eine erniedrigte Wachstumsgeschwindigkeit und eine Körperhöhe von mindestens 2,5 SD unter dem altersentsprechenden Durchschnitt aufweist. Ein weiteres Kriterium ist eine Abweichung von mindestens -1 SD von der prognostischen Zielgröße. Andere Gründe für den Kleinwuchs müssen vorher ausgeschlossen werden, daher ist eine frühe und umfangreiche Diagnostik zur Abklärung von Differentialdiagnosen besonders wichtig (Chatelain et al. 2007).

1.2 Genomisches Imprinting

Die Epigenetik beschäftigt sich mit vererbaren Eigenschaften, die nicht in der DNA-Sequenz festgelegt sind (Cutfield et al. 2007). Die Mechanismen, die die Aktivität von Abschnitten oder ganzen Chromosomen beeinflussen, bezeichnet man dabei als epigenetische Modifikation. Epigenetische Veränderungen können dazu führen, dass die Expression eines Gens abhängig davon ist, von welchem Elternteil das Allel stammt (Imprinting) (Cattanach & Kirk 1985). Diese dem Imprinting unterliegende Gene besitzen eine genomische/elterliche Prägung.

Genomisches Imprinting wurde in den frühen 80er Jahren entdeckt, als man in Experimenten mit Mäusen herausfand, dass Gene bei gleicher DNA-Sequenz abhängig von ihrer parentalen Herkunft unterschiedlich exprimiert werden können (McGrath & Solter 1984; Surani et al. 1984). Weitere Hinweise lieferten paternale und

maternale uniparentale Disomien (UPDs), bei denen beide Kopien oder Anteile eines Chromosoms von einem Elternteil stammen (Engel 1980). Bei einer UPD liegen beide Allele mit derselben elterlichen Prägung vor. Sofern bei einer UPD eine dem Imprinting unterliegende Region betroffen ist, kann es somit zu einer vermehrten Aktivierung bzw. Inaktivierung von Erbanlagen kommen. Dies kann mit Störungen der normalen Entwicklung und des Wachstums einhergehen (Horsthemke 2006).

Neben einer UPD kann einer unterschiedlichen Expression von Erbanlagen innerhalb von Regionen, die dem Imprinting unterliegen, eine fehlerhafte Prägung eines elterlichen Allels zugrunde liegen (Epimutation) (Horsthemke 2006). Bisher sind beim Menschen mehr als 100 verschiedene Gene postuliert, die einer elterlichen Prägung unterliegen (www.geneimprint.com).

Es sind verschiedene Mechanismen der epigenetischen Regulation bekannt. Hierzu zählen die DNA-Methylierung, die Histon-Modifikation, Veränderungen der Chromatinstruktur sowie die Regulation der Genexpression mittels non-coding RNAs (ncRNA) (Choudhuri et al. 2010). Der bisher am besten untersuchte Mechanismus der genomischen Prägung ist die DNA-Methylierung. Diese erfolgt an 5'-Cytosin-Nukleotiden innerhalb von CG-Dinukleotiden (CpGs) durch eine DNA-Methyltransferase (DNMT), einzeln vorliegende Cytosin-Nukleotide werden dabei in der Regel nicht methyliert (Li et al. 1993).

Die elterliche Prägung wird in den primordialen Keimzellen gelöscht, um dann in der späteren Keimzellentwicklung geschlechtsspezifisch neu etabliert zu werden. Sie wird dann bei den somatischen Zellteilungen während der gesamten postzygotischen Entwicklung stabil weitergegeben (Reik & Walter 2001).

Gene, deren Expression über die elterliche Prägung reguliert wird, sind meist in Clustern mit anderen geprägten Genen organisiert (Constância et al. 1998). Ihre Expression wird von sogenannten Imprinting Centers (IC) kontrolliert. Diese sind reich an CpG-Inseln (Paulsen et al. 2000), deren Sequenzen sich durch einen hohen Cytosin-Guanin-Gehalt auszeichnen. Sie weisen in Regionen der elterlichen Prägung eine unterschiedliche DNA-Methylierung zwischen paternalem und maternalem Allel auf und werden daher als differentiell methylierte Regionen (DMRs) bezeichnet (Neumann et al. 1995). Die DMRs können unterschiedliche Eigenschaften haben: bei einigen ist das inaktive (imprintete) Allel methyliert, andere liegen auf dem aktiven

Allel methyliert vor (Choudhuri et al. 2010). Durch die monoallele Expression kann ein Funktionsverlust des aktiven Allels nicht durch das zweite Allel kompensiert werden.

Ein großer Anteil der bisher identifizierten Gene, die dem Imprinting unterliegen, ist in seiner Funktion bisher noch nicht entschlüsselt. Es wurde gezeigt, dass die Genprodukte vieler bekannter elterlich geprägter Gene in die Kontrolle des prä- und postnatalen Wachstums involviert sind, weshalb auch SGA-Geburtlichkeit mit Imprintingstörungen assoziiert wird (Miozzo & Simoni 2002).

1.3 SGA als Phänotyp von Imprintingstörungen

Bei einer Subgruppe von SGA-geborenen Kindern lässt sich die Ätiologie auf eine Störung des Imprinting zurückführen. Viele dem Imprinting unterliegende Gene sind in die Kontrolle des fetalen Wachstums und in die Steuerung von Verhalten und Gehirnfunktionen involviert (Tycko & Morison 2002). Beispiele hierfür sind der Insulin-Like-Growth-Factor (*IGF2*), der direkt als Wachstumsfaktor fungiert, und *GRB10*, welches über die Regulation der Genexpression Einfluss auf die Kontrolle des Wachstums nimmt (Butler 2009). Bei vielen bekannten Imprintingsyndromen, wie beispielsweise dem TNDM oder dem SRS, kann eine intrauterine Wachstumsretardierung beobachtet werden (siehe 1.4). Aus diesen Überlegungen wurde die Vermutung abgeleitet, dass SGA-Geburtlichkeit mit Veränderungen der elterlichen Prägung an bekannten oder bisher nicht identifizierten Loci verbunden sein könnte.

1.4 Imprintingsyndrome

Einige Imprintingdefekte führen zu bekannten Syndromen, von denen eine Auswahl im Folgenden näher beschrieben werden soll.

1.4.1 Prader-Willi-Syndrom (PWS) und Angelman-Syndrom (AS)

Das Prader-Willi-Syndrom (PWS) und das Angelman-Syndrom (AS) sind die ersten bekannten Beispiele menschlicher Erkrankungen, in welche genomisches Imprinting involviert ist (Buiting 2010). Beide Syndrome sind auf Veränderungen an eng benachbarten Genen in der chromosomalen Region 15q11-q13 zurückzuführen, welche ein großes Cluster imprinteter Gene beinhaltet (siehe Abb. 1). Der klinische Phänotyp ist jedoch sehr unterschiedlich. Gene, die auf dem maternalen Allel durch DNA-Methylierung der Promoterregion inaktiviert sind, werden paternal exprimiert. Hierzu zählen u. a. *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN* und *SNURF-SNRPN*, welche bei Funktionsverlusten zum PWS führen (Buiting 2010). Als verantwortliches Gen für den AS-Phänotyp wurde *UBE3A* identifiziert, das durch Mutationen oder Imprintingdefekte inaktiviert sein kann (Runte et al. 2004). Es wird physiologisch vom maternalen Allel exprimiert, weist aber keine differentielle DNA-Methylierung auf, so dass eine Regulation über das paternal exprimierte *SNURF-SNRPN* sense/*UBE3A* antisense Transkript vermutet wird (Runte et al. 2004).

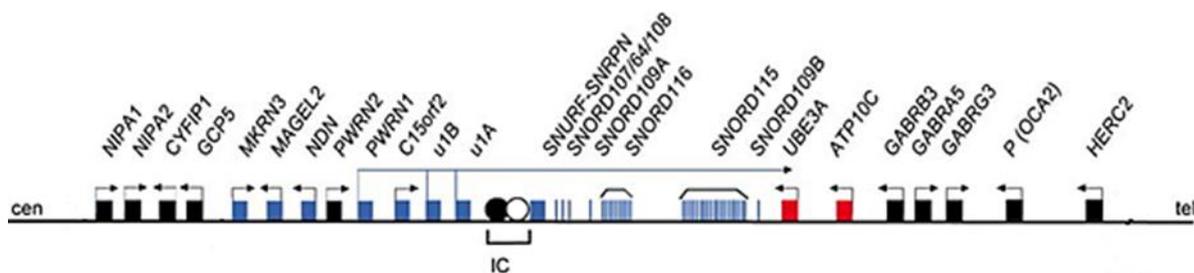


Abbildung 1: Schematische Darstellung der imprinteten Region 15q11-q13 (modifiziert nach Buiting 2010).

Abgebildet ist die imprintete Region 15q11-13. Die Farbe der Quadrate gibt die Art der Expression des jeweiligen Gens an. Blau = paternale Expression, rot = maternale Expression, schwarz = biallele Expression. Die horizontalen Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. Cen = Zentromer, tel = Telomer, IC = Imprinting Center.

Beide Syndrome sind zum Großteil (~70%) auf *de novo* Deletionen der jeweils aktiven Region 15q11-q13 zurückzuführen. Die maternale UPD 15 ist für etwa 25% der PWS-Fälle verantwortlich, während beim AS eine paternale UPD 15 nur in 2-5%

vorkommt und zu etwa 10% Mutationen des *UBE3A*-Gens ursächlich sind (Buiting 2010). Bei ca. 1-4% der PWS- und AS-Patienten ist die Erkrankung auf Imprintingdefekte zurückzuführen (Buiting 2010).

Das PWS wurde erstmals 1956 von Prader, Labhart und Willi beschrieben und tritt mit einer Häufigkeit von etwa 1:10.000 bis 1:20.000 Geburten auf. Im klinischen Verlauf steht im Säuglingsalter zunächst eine muskuläre Hypotonie im Vordergrund, die sich in Form einer ausgeprägten Trinkschwäche äußert und häufig zu Gedeihstörungen führt (Butler 2009). Die Patienten sind zunächst untergewichtig. Ab etwa dem 1. Lebensjahr prägt sich aufgrund eines fehlenden Sättigungsgefühls eine Hyperphagie aus, aus der sich eine zunehmende Adipositas entwickeln kann (Goldstone 2004). Diese stellt im weiteren Verlauf das größte Problem der Patienten dar. Zu den charakteristischen Dysmorphiezeichen zählen eine schmale Stirn, ein zeltförmiger Mund und mandelförmige Augen sowie ein Kleinwuchs und kleine Hände und Füße (Butler 1990). Weiterhin zeigen die Patienten eine genitale Hypoplasie sowie Verhaltensauffälligkeiten und weisen häufig eine geistige Retardierung (IQ durchschnittlich 65) auf (Butler 2009).

Die Inzidenz des AS ist vergleichbar mit der des PWS. Charakteristisch für das AS sind eine Mikrozephalie, eine Gangataxie, eine mentale Retardierung und eine fehlende Sprachentwicklung (Williams et al. 2006). Außerdem zeigen Patienten mit AS Verhaltensauffälligkeiten wie grundloses Lachen und Schlafstörungen, etwa 80% haben epileptische Anfälle mit charakteristischen EEG-Veränderungen (symmetrische, langsame Kurven mit hoher Spannung) (Williams et al. 2006). Typische Dysmorphiezeichen sind ein flaches Hinterhaupt, ein relativ großer Mund mit kleinen, weit auseinanderstehenden Zähnen und einer ungewöhnlich hervorstehenden Zunge. Die Patienten haben häufig eine hypopigmentierte Haut, helle Haare und blaue Augen, ab der Pubertät kann sich eine Skoliose entwickeln (Williams et al. 2006).

1.4.2 Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) und Silver-Russell-Syndrom (SRS)

Das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS), dessen Erstbeschreibung 1964 erfolgte (Wiedemann 1964, Beckwith 1969), und das Silver-Russell-Syndrom (SRS), erstmals 1953 beschrieben (Silver et al. 1953, Russel 1954), sind Wachstumsstörungen mit gegensätzlichem Phänotyp.

Das BWS tritt mit einer Häufigkeit von 1:15.000 Geburten auf. Klinisch manifestiert es sich mit einer Makrosomie, hoher Muskelmasse, Makroglossie, Hemihyperplasie und neben weiteren charakteristischen Merkmalen einem erhöhten Risiko für intraabdominelle Tumoren (z.B. Wilms-Tumor). Zum Großteil sind Imprintingdefekte auf Chromosom 11 Ursache für das BWS, in weiteren 20% liegt eine paternale UPD 11p15.5 zugrunde (Temple et al. 2007).

Kinder mit SRS zeigen eine prä- und postnatale Wachstumsretardierung, eine relative Makrozephalie, ein dreieckiges Gesicht, Skelettasymmetrien und weitere milde Dysmorphiezeichen (Price et al. 1999). Die Inzidenz liegt bei 1:75.000 Geburten. Ursächlich sind viele Gene auf verschiedenen Chromosomen involviert. Etwa 50% sind auf epigenetische und genetische Mutationen auf Chromosom 11p15 zurückzuführen und weitere 10% der Fälle sind mit einer maternalen UPD 7 assoziiert (Abu-Amero et al. 2008; Eggermann et al. 2010).

In der dem Imprinting unterliegenden chromosomalen Region 11p15.5 befinden sich geprägte Gene, die eine entscheidende Rolle für das fetale Wachstum haben (Demars et al. 2010). Diese Gene sind in zwei benachbarten Bereichen organisiert, IGF2/H19 und KCNQ1 (siehe Abb. 2). Die Genexpression dieser Bereiche wird jeweils durch eine Imprinting-Kontroll-Region (ICR1 und ICR2) reguliert (Abu-Amero et al. 2008). Epigenetische Mutationen dieser Regionen sind bei etwa 60-70% der Patienten mit BWS und SRS zu finden (Demars et al. 2010). Das ICR1 ist ausschließlich paternal methyliert und reguliert durch Bindung des Zinkfinger-Proteins CTCF den Aktivitätszustand der Gene *IGF2/H19* (Bell & Felsenfeld 2000). Eine paternale Prägung des maternalen Allels der Region ist für ~10% der BWS ursächlich. Eine Hypomethylierung des paternalen Allels hingegen führt zu einem SRS (~60% der SRS). Methylierungsverluste der ICR2-KCNQ1-Region führen zum BWS (~60%) (Demars et al. 2010).

Die genetische Grundlage des SRS ist sehr heterogen. Neben der chromosomalen Region 11p15.5 sind weitere chromosomale Regionen, wie z.B. 7q32, mit dem SRS assoziiert (Abu-Amero et al. 2008). So sind auch imprintete Gene mit paternaler Expression der Region 7q32, u. a. *MEST* und *PEG1*, sowie auch das überwiegend maternal exprimierte *GRB10* (7p11-p13) Kandidatengene (Abu-Amero et al. 2008). Eine maternale UPD 7 ist in etwa 10% Ursache für das SRS (Butler 2009).

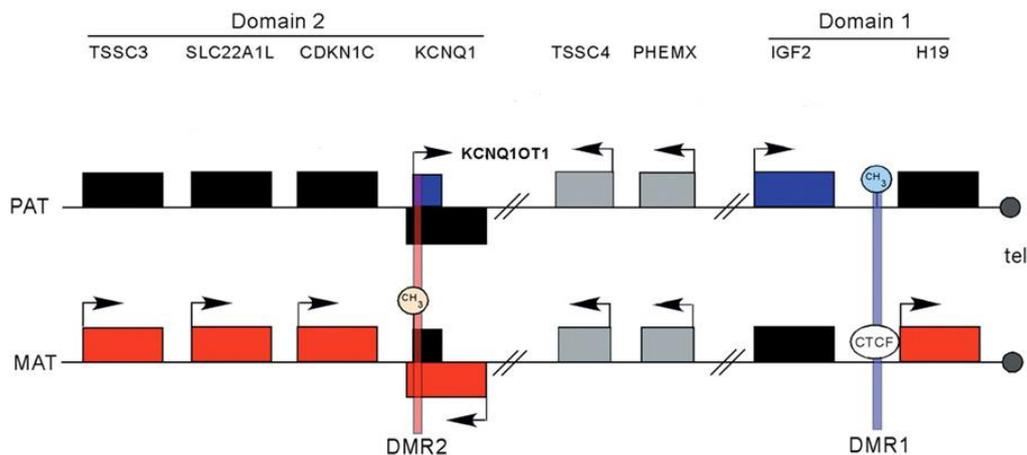


Abbildung 2: Schematische Darstellung der imprinteten Region in 11p15 (modifiziert nach Weksberg et al. 2003).

Dargestellt sind die Domain 1 und 2 der imprinteten Region in 11p15. Pat/ Mat = paternales/ maternales Allel. Maternal exprimierte Gene = rote Kästen, paternal = blau, grau = nicht-imprintete Gene. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. DMR 1 und 2 sind als blauer bzw. roter Balken dargestellt. Methylierung wird mit Kreisen mit Methylgruppen (CH₃) angezeigt.

1.4.3 Temple-Syndrom (TS)

Karen Temple (Temple et al. 1991) beschrieb 1991 erstmals den Phänotyp einer maternalen UPD 14. Dieser ist gekennzeichnet durch eine prä- und postnatale Wachstumsretardierung, Hypotonie, hyperextendible Gelenke, eine motorische Entwicklungsverzögerung und eine mentale Retardierung. Außerdem treten eine vorzeitige Pubertät und dezente Dismorphiezeichen an Fazies, Händen und Füßen auf. Patienten mit Temple-Syndrom (TS) zeigen einen ähnlichen Phänotyp ohne Nachweis einer maternalen UPD 14 (Temple et al. 2007).

Mit dem TS wurde ein Locus auf Chromosom 14q32 assoziiert, der eine Reihe geprägter Gene beinhaltet. In dem Gen-Cluster befinden sich das paternal exprimierte Gen *DLK1*, ein Wachstumsregulator, sowie das maternal exprimierte Gen *MEG3* (auch *GLT2*) (Geuns et al. 2007). Diese Region steht unter Kontrolle zweier differentiell methylierter Regionen, der paternal methylierten intergenetischen IG-DMR und der *MEG3*-DMR. Störungen der Methylierung innerhalb dieser Region können ursächlich für ein TS (upd(14)mat Syndrom) sein (Geuns et al. 2007).

1.4.4 Transienter neonataler Diabetes mellitus (TNDM) und assoziiertes Hypomethylierungssyndrom

Die Inzidenz des transienten neonatalen Diabetes mellitus (TNDM) beträgt 1:400.000 Geburten (Mackay et al. 2002). Der TNDM manifestiert sich innerhalb der ersten Lebenswochen mit einer Wachstumsretardierung und persistierenden Hyperglykämien. Meist ist eine Insulintherapie zur Normalisierung des Blutzuckers nötig. Bis zum 18. Lebensmonat kommt es zur Remission, das weitere Wachstum verläuft normal. Etwa 40% der TNDM-Patienten entwickeln in ihrem späteren Leben einen Diabetes mellitus Typ 2 (Temple 2007).

Ursache für den TNDM ist die Überexpression der paternal exprimierten Gene *PLAGL1/ZAC* und *HYMAI* in der chromosomalen Region 6q24 (Mackay et al. 2002). Die Expression beider Gene steht unter Kontrolle einer differentiell methylierten CpG-Insel, welche auf dem maternalen Allel methyliert und inaktiv sowie auf dem paternalen Allel unmethyliert und aktiv vorliegt. *PLAGL1* kodiert für ein Zinkfingerprotein, das als Transkriptionsfaktor fungiert und die Zellproliferation inhibiert (Mackay et al. 2002).

Mechanismen, die zur Überexpression von *PLAGL1/HYMAI* führen, sind in 40% eine paternale UPD 6, in 40% eine paternale Duplikation der Region 6q24 und zu 20% ein Methylierungsverlust des maternalen Allels (Loss of methylation, LOM) in der TNDM-DMR (Temple 2007).

Etwa 50% der Patienten mit TNDM zeigen neben dem Methylierungsverlust der Region 6q24 eine Hypomethylierung anderer geprägter Genorte und zusätzliche klinische Merkmale wie Entwicklungsverzögerung und angeborene Herzfehler

(maternales Hypometylierungssyndrom). Zu den zusätzlich von einer Hypomethylierung betroffenen Genorten zählen z. B. *GRB10* und *PEG3*. Maternale Hypomethylierungssyndrome können mit Mutationen des Gens *ZFP57* assoziiert sein. Auch bei einem dem BWS ähnlichen Phänotyp konnte eine multiple Hypomethylierung beobachtet werden (Mackay et al. 2008).

1.4.5 Übersicht über die hier vorgestellten Imprintingsyndrome

Die unter 1.4 vorgestellten Imprintingsyndrome werden in Tab. 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Übersicht über die vorgestellten Imprintingssyndrome (siehe 1.4)

Syndrom	Betroffene Gene und chromosomale Region	Inzidenz	Ursachen und Häufigkeit von Imprinting Defekten (ID)	Klinische Merkmale
Prader-Willi-Syndrom (PWS)	<i>MKRN3</i> <i>MAGEL2</i> <i>NDN</i> <i>SNURF-SNRPN</i> (15q11-q13)	1:10.000 bis 1:25.000	70% de novo Deletion 25% matUPD15 ID ~1%	Säuglingsalter: Hypotonie, Trinkschwäche, Gedeihstörung; später Hyperphagie, Adipositas; Fazies: schmale Stirn, zeltförmiger Mund, mandelförmige Augen; Kleinwuchs, kleine Hände und Füße, Hypogonadismus
Angelman-Syndrom (AS)	<i>UBE3A</i> <i>ATP10</i> (15q11-q13)	1:12.000 bis 1:20.000	70% de novo Del.; 2-5% patUPD15, 10% Mut. d. <i>UBE3A</i> -Gens, ID ~4%	Mikrozephalie, Gangataxie, mentale Retardierung, fehlende Sprachentwicklung, grundloses Lachen, Krampfanfälle, typische Fazies
Beckwith-Wiedeman-Syndrom (BWS)	<i>IGF2</i> <i>H19</i> <i>KNCQ1</i> (11p15.5)	1:15.000	20% patUPD11 ID ~60%	Makrosomie, Makroglossie, Bauchwanddefekte, Organomegalie, Hemihypertrophie, neonatale Hypoglykämie, intraabdominelle Tumore
Silver-Russell-Syndrom (SRS)	<i>IGF2</i> (11p15.5) <i>H19</i> (11p15.5) <i>MEST/PEG1</i> (7q32) <i>GRB10</i> (7p11-p13)	1:3.000 bis 1:100.000	10% matUPD7 ID ~50%	Prä-/postnatale Wachstumsretardierung, Skelettasymmetrie, dreieckige Gesichtsform; vermehrtes Schwitzen, verzögerte Knochenreife, Herzfehler
Temple-Syndrom (TS) bzw. upd(14)mat Syndrom	<i>MEG3</i> <i>DLK1</i> (14q32)		upd14mat ID ?	Adipositas, muskuläre Hypotonie, motorische Entwicklungsverzögerung, Kleinwuchs, Pubertas praecox
Transienter neonataler Diabetes mellitus (TNDM)	<i>PLAGL1</i> (6q24)	1:400.000	40% patUPD6, 40% pat Duplikation 6q24, ID ~30%	Schwere intrauterine Wachstumsretardierung; Hyperglykämien bis zum 18. LM, Dehydration

Del. = Deletion, Mut. = Mutation, LM = Lebensmonat, pat. = paternal, mat. = maternal, ID = Imprintingdefekt, UPD = unipaternale Disomie.

1.5 Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit

Wie dargestellt können Störungen des genomischen Imprinting eine, wenn auch seltene, Ursache für SGA-Geburtlichkeit darstellen. In dieser Arbeit wurden 50 Kinder, die die Kriterien der SGA-Geburtlichkeit erfüllen, auf das Vorliegen von Methylierungsveränderungen untersucht. Für das Screening wurde eine Methylierungsanalyse an 11 verschiedenen elterlich geprägten Genorten (siehe Tab. 2) durchgeführt. Die ausgewählten Genorte sind in die Regulation des fetalen Wachstums involviert oder spielen bei bekannten Imprintingsyndromen, die mit Wachstumsstörungen einhergehen, eine Rolle.

Ziel dieser Arbeit war es, Methylierungsstörungen zu identifizieren und Aufschluss über die Häufigkeit und das Spektrum des Vorliegens von Imprintingstörungen bei SGA-geborenen Kindern zu erlangen. Die Ergebnisse sollen zu einem besseren Verständnis der SGA-Geburtlichkeit beitragen und eine diagnostische Differenzierung der verschiedenen Ursachen von SGA-Geburtlichkeit verbessern.

Tabelle 2: Übersicht über die untersuchten Genorte

Gen	chromosomale Region	Assoziierte Imprintingstörung	methyliertes Allel	exprimiertes Allel	Referenz
<i>DIRAS3</i>	1q31		maternal	paternal	(Yu et al. 2003)
<i>PLAGL1</i>	6q24	TNDM	maternal	paternal	(Arima et al. 2001)
<i>IGF2R</i>	6q25		maternal	paternal	(Smrzka et al. 1995)
<i>MEST</i>	7q13	SRS/BWS	maternal	paternal	(Abu-Amero et al. 2008)
<i>IGF2</i>	11p15	SRS/BWS	maternal	paternal	(Demars et al. 2010)
<i>H19</i>	11p15	SRS/BWS	paternal	maternal	(Abu-Amero et al. 2008)
<i>MEG3</i>	14q32	Upd(14)mat. Syndrom	paternal	maternal	(Temple et al. 2007)
<i>SNRPN</i>	15q11	PWS/AS	maternal	paternal	(Zeschnick et al. 1997)
<i>NDN</i>	15q11	PWS/AS	maternal	paternal	(Buiting 2010)
<i>NESP</i>	20q13	PHP	paternal	maternal	(Izzi et al. 2010)
<i>NESPAS</i>	20q13	PHP	maternal	paternal	(Izzi et al. 2010)

2 Material und Methoden

Dieser Abschnitt erläutert die in dieser Arbeit angewandten Untersuchungsmethoden und führt die dafür notwendigen Materialien auf.

2.1 Untersuchungsmaterial

Für die Methylierungsanalysen wurde ein Kollektiv aus 50 SGA-geborenen Patienten sowie ein Kontrollkollektiv aus gesunden Probanden benötigt.

2.1.1 Patientenkollektiv

Diese Studie wurde im Rahmen des BMBF-geförderten Konsortiums „Diseases caused by imprinting defects: clinical spectrum and pathogenetic mechanisms“ durchgeführt. Es wurde ein Patientenkollektiv bestehend aus insgesamt 50 Kindern, die die Kriterien der SGA-Geburtlichkeit (Niklasson & Albertsson-Wikland 2008) erfüllten, untersucht. Hierzu wurden Patienten einbezogen, die bereits im Institut für Humangenetik oder in der Abteilung für Pädiatrie des UKSH betreut wurden und bei denen ein Einverständnis der Eltern bzw. Patienten zur Studienteilnahme vorlag. Ein weiterer Teil der Probanden wurde über die Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe neu rekrutiert. Mittels Fragebogen wurden Angaben zum Vorliegen von maternalen Faktoren mit Einfluss auf die pränatale Entwicklung wie Nikotin- und Alkoholkonsum, Gestationsdiabetes, EPH-Gestose und Plazentainsuffizienz erhoben. Für die Untersuchungen wurden Proben von peripherem Blut der SGA-geborenen Patienten verwendet. Von den 50 untersuchten SGA-geborenen Patienten waren 35 männlichen und 15 weiblichen Geschlechts, der Altersdurchschnitt lag bei 7,8 Jahren. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt (Nummer B 305/08).

2.1.2 Kontrollkollektiv

Für die Zusammenstellung eines Kontrollkollektivs von 50 Proben wurden je zehn Proben von je fünf männlichen und fünf weiblichen gesunden Probanden aus den

fünf innerhalb des BMBF-geförderten Netzwerkes „Imprintingkrankungen“ kollaborierenden Zentren in Aachen, Essen, Lübeck, Mainz und Kiel bereitgestellt.

Im Rahmen der Pyrosequenzierung wurden als Positivkontrolle eine vollständig methylierte Probe (Millipore, Schwalbach, Deutschland) sowie eine physiologisch methylierte Probe, bestehend aus peripherem Blut von jeweils zehn gesunden männlichen und weiblichen Probanden, mitgeführt.

2.2 Materialien

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Materialien aufgeführt.

2.2.1 Reagenzien und Chemikalien

Tab. 3 zeigt die verwendeten Reagenzien und Chemikalien und deren Hersteller.

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien/ Chemikalien	Hersteller
<u>DNA-Extraktion:</u>	
Cell Lysis Solution	Genra Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Protein Precipitation Solution	Genra Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
RCB-Lysis Solution	Genra Puregene Blood Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
<u>Bisulfitkonversion:</u>	
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Universell methylierte DNA	Millipore, Schwalbach, Deutschland
<u>PCR:</u>	
AccuPrime 10x PCR Puffer II	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
AccuPrime Taq DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
AmpliTaq Gold DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
CoralLoad	Qiagen, Hilden, Deutschland
Aqua bidest (ddH20)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
dNTPs	Roche, Mannheim, Deutschland
MgCl ₂ , 25 mM	Eurogentec, Seraing, Belgien
<u>Gelelektrophorese:</u>	
Agarose	Eurogentec, Seraing, Belgien
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Reagenzien/ Chemikalien	Hersteller
TriDye 100 bp DNA-Längenstandard	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
<u>Pyrosequenzierung:</u>	
Annealing-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Binding-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
NaOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
Streptavidin coated Sepharose Beads	GE-Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

2.2.2 Puffer, Lösungen und Gele

Gelelektrophorese:

2%iges Agarosegel: 6 g Agarose wurden mit 300 ml 10x TBE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen auf Handwärme wurden 15 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugefügt und das Gel zum Erkalten in eine Gelkammer gegossen und mit Taschenkämmen versehen.

TBE (Tris-Borat EDTA)-Puffer (10 x Stock Solution): 108 g Tris Base (890 mM), 55 g Borsäure (890 mM) und 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 (20 mM) werden in Aqua dest. auf eine Gesamtmenge von einem Liter gelöst.

Pyrosequenzierung:

Waschpuffer: 1,21 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan wurden mit ddH₂O zu einer Gesamtmenge von 1 L aufgefüllt.

2.2.3 Kits

In Tab. 4 folgt eine Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Kits.

Tabelle 4: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
EpiTect Bisufite Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Gentra Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Pyromark Gold Q96 Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.2.4 Primer

Die Primersequenzen für die Methylierungsassays wurden von Frau Dr. J. Richter und Frau Dipl. Bio. A. Haake für das Institut für Humangenetik erstellt (Haake, 2009) und von Biomers (Ulm, Deutschland) bezogen und sind in Tab. 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Auflistung aller verwendeten Primer

Assay	Vorwärtsprimer (Name; Sequenz)	Rückwärtsprimer (Name; Sequenz)	Sequenzier- primer (Name; Sequenz)
DIRAS3_1q31	<u>F-6848:</u> 5'-TTTTAAGTTTTAT AGGAAGATTAGA-3'	<u>R-6849:</u> 5'-Biotin-CTTCCAAA ATTCCTTCTTA-3'	<u>6850:</u> 5'-AGTTTTATAG GAAGATTAG-3'
H19_6CTCF_11p15	<u>F-5617:</u> 5'-GGTATTTTTGGAGGT TTTTTTTTAGTTTTATA GT TTGGATGGTA-3'	<u>R-5618:</u> 5'-Biotin-CCACCT AAAAATCTAATACCACTCC YATAAATATCCTATTCC-3'	<u>5620:</u> 5'-TAGGTTTATAT ATTATAGTTTGAG T-3'
IGF2_11p15	<u>F-5608:</u> 5'-GGATTAGATTTTT AGRTTATTTAGGGT GGTGTGTGG-3'	<u>R-5609:</u> 5'-Biotin-AAAA AACCCAAACCC TTCTATTAACAACTACCCTAT TC-3'	<u>5611:</u> 5'-TTTGGAG GTGGAGGA-3'
IGF2R_6q25	<u>F-7152:</u> 5'-Biotin-AGTTTTTGT TTGGTTTTGT-3'	<u>R-7153:</u> 5'-TAACCCCTCTA TATCAAAAA-3'	<u>7154:</u> 5'-TATCAAAAA CCCCTAC-3'
MEG3_14q32	<u>F-5956:</u> 5'-Biotin-GTGGTA GGTTTTGGAAG GTTTTT GGTGGT-3'	<u>R-5833:</u> 5'-CTTCCCCCCCAA ACATCAACATCAC-3'	<u>5835:</u> 5'-AACCACTAA AAATCAACTA-3'
MEST_7q32	<u>F-5815:</u> 5'-Biotin-GGAGG GGTTTTGAGGAGAG TAAGGGAGTAG-3'	<u>R-5816:</u> 5'-CCATTACCAACAAAA ATAACACCCCTCC TCAAATAAAC-3'	<u>5822:</u> 5'-AAAAATAC CCAAATATAC TAATTAC-3'
NDN_15q11	<u>F-5773:</u> 5'-Biotin-AGATTTTGGT TAGGAATTTATGATT TGTATTTTGGTGA-3'	<u>R-5774:</u> 5'-AACAAACCCCATACCC ATAACAAACCTCCTACT-3'	<u>5775:</u> 5'-CATAATCCTAA ACCTCATCTAC-3'
NESP_20q13	<u>F-7102:</u> 5'-Biotin-TTTAGAGT TTTAGGGAAGGG-3'	<u>R-7103:</u> 5'-CTTCTCACCTCC TTTCCA-3'	<u>7105:</u> 5'-CCTTTTTAAA AAAAAACT-3'
NESPAS_20q13	<u>F-7106:</u> 5'-GGTAGTTTATTT TAAGAGGTTGTTAGA-3'	<u>R-7107:</u> 5'-Biotin-CCTCCTCAAC TAAAAATCTCTCTA-3'	<u>7108:</u> 5'-GTTTATTTTA AGAGGTTG-3'
PLAGL1_6q24	<u>F-5525:</u> 5'-GGGTAGTTGTAT TTGGGAGTTGTTGG TATAGGAGGTAA-3'	<u>R-5526:</u> 5'-Biotin-AACCCAATCA CCCATAAAAAACAAA ACCAAAATC-3'	<u>5527:</u> 5'-TAGAGTTTTTTT ATGTGTGATTG-3'
SNRPN_15q11	<u>F-5786:</u> 5'-Biotin-GGTG AGG GAGGGAGTTGGG ATTTTTGTAT-3'	<u>R-5787:</u> 5'-CCCCTCCCCAA ACTATCTCTTAAAAA AAACCACC-3'	<u>5788:</u> 5'-CCCACACAAC TAACCTTAC-3'

2.2.5 Geräte und Software

Die verwendeten Geräte und Software sind in Tab. 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Geräte und zugehörige Software

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller
Geldokumentation	BioDoc Analyzer	Biometra, Göttingen, Deutschland
Gelkammer	Hoefler HE 33	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Gelkammer	Modell 41-2026	peqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Hybridisierungssofen		Biometra, Göttingen, Deutschland
Laborzentrifuge	Universal 16	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Mikrowelle	M500	Philips, Hamburg, Deutschland
PCR-Aufreinigungsstation	VacuumPrep Workstation	Qiagen, Hilden, Deutschland
Plattenschüttler	MS 3 basic	IKA, Staufen, Deutschland
Pyrosequenzierer	PyroMark ID	Biotage, Uppsala, Schweden
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000	peqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Thermocycler	T3000	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vakuumpumpe	MultiScreen HTS Vacuum Manifold	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Vakuumpumpe	SpeedVac RC 1010	Thermo Scientific, Waltham, USA
Vortexer	REAX2000	Heidolph, Schwalbach, Deutschland
Waage	MC 1 Laboratory LC620P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Julabo	Seelbach, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge primoR	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	Megafuge 1.OR	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	Mikro 200	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Software	BioDoc Analyze Software Version 2.1	Biometra, Göttingen, Deutschland
Software	Excel	Microsoft, Redmond, USA
Software	Methylierungssoftware Version 3.4	Biotage, Uppsala, Schweden
Software	GraphPad Prism Version 5.0 für Windows	GraphPad Software, San Diego, California, USA (www.graphed.com)

2.3 Methoden

Nachfolgend werden die in dieser Arbeit angewandten Untersuchungsmethoden erläutert.

2.3.1 DNA-Extraktion und -Quantifizierung

Dieser Abschnitt erläutert die Methoden zur DNA-Extraktion und -Quantifizierung.

2.3.1.1 DNA-Extraktion

Während der Rekrutierungsphase wurden die Blutroben bei -80°C asserviert. Die Isolation der genomischen DNA aus peripherem Blut erfolgte gesammelt mit dem Kit Gentra von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers. Zur Extraktion der DNA wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt.

Zunächst wurde das Probenmaterial (hier EDTA-Blut) aufgetaut, hierzu wurde es für ca. 10 min bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Anschließend wurden 5 ml des Probenmaterials (bei abweichendem Probenvolumen mussten alle weiteren Lösungsmengen im entsprechenden Verhältnis angepasst werden) in ein 50 ml Röhrchen überführt und 15 ml RCB-Lösung hinzugefügt, durch Schwenken des Röhrchens vermischt und dann für 10 min bei 2600 U/min zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus). Dabei setzte sich am Boden des Röhrchens ein Pellet ab, der Überstand wurde verworfen und das Pellet noch weitere zweimal mit RCB-Lösung gewaschen. Das nun weißliche Pellet wurde dann in 5 ml Cell Lysis Solution resuspendiert und 72 Stunden im Hybridisierungssofen bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation sollte sich das Pellet gelöst haben und die Probe eine klare Färbung zeigen. Die Probe wurde nun auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 1,7 ml Protein Precipitation Lösung versetzt und anschließend gevortext. Dann wurde die Probe für mindestens 15 min bei 3600 U/min zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus), der Überstand in ein frisches 15 ml Röhrchen überführt und etwa die gleiche Menge Isopropanol dazugegeben.

Nun wurde das Röhrchen geschwenkt, bis die DNA als weißer Faden ausfiel. Dieser wurde dann mit einer Pipette in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und mit 500 μl

70 %igem Ethanol gewaschen. Nachdem das Eppendorfgefäß bei 15000 U/min ca. 1 min zentrifugiert (Biofuge primoR, Heraeus) wurde, wurde der Überstand abgekippt und das im Eppendorfgefäß verbliebene Pellet für 10-20 min in der Speedvac getrocknet und mit ca. 100 µl Aqua dest. über Nacht gelöst.

2.3.1.2 DNA-Quantifizierung

Die Konzentration der DNA sowie deren Qualität wurden mit dem NanoDrop ND-1000-Spektrophotometer und zugehöriger Software (Version 3.2.1.) nach Anleitung des Herstellers bestimmt. Das Spektrophotometer misst die optische Dichte der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm, als Referenzwert dient destilliertes H₂O.

Zur Durchführung wurden 2 µl der Probe auf die Messapparatur pipettiert und der Messvorgang gestartet. Die ermittelte Nukleinsäure-Konzentration (ng DNA pro µl H₂O) war direkt einsehbar. Als Maß für die Reinheit der Probe wurde die Absorption in Abhängigkeit von der Wellenlänge (in nm) ermittelt und der Ratio-Wert 260/280 bzw. 260/230 bestimmt. Dieser sollte bei reiner DNA etwa 1,8 bzw. 1,8 bis 2,2 betragen, deutlich niedrigere Werte sprachen für eine Verunreinigung der Probe z. B. durch Proteine.

2.3.2 Bisulfitkonvertierung

Vor der Analyse des Methylierungsstatus der DNA erfolgte eine Natrium-Bisulfit-Vorbehandlung. Das Prinzip der Methode beruht auf der chemischen Umwandlung nicht-methylierter Cytosin-Basen zu Uracil, wohingegen methylierte Cytosine durch die Methylgruppe an Position C5 gegen die Desaminierung geschützt sind (siehe Abb. 3). Anschließend ist die DNA für alle gängigen Methoden der Methylierungsanalyse, u. a. die Pyrosequenzierung, geeignet.

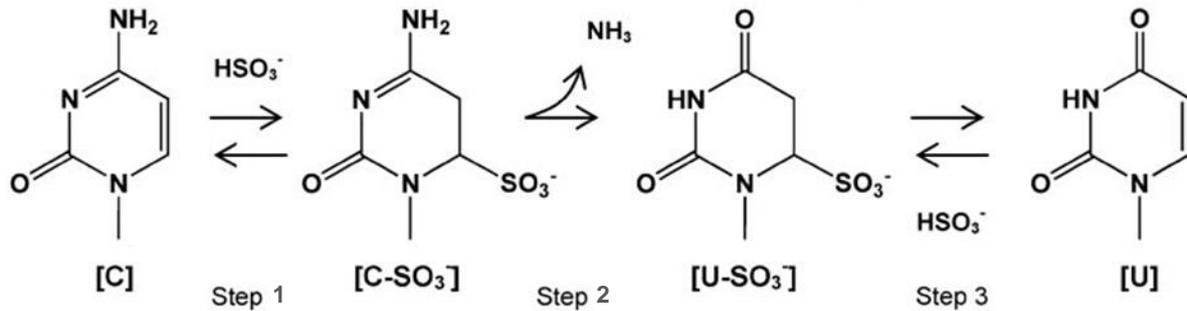


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Natrium-Bisulfit-Konversion (modifiziert nach Hayatsu, 2009)

Schematische Darstellung der Natrium-Bisulfit-Konversion von unmethyliertem Cytosin zu Uracil. Im ersten Schritt erfolgt die Sulfonierung von Cytosin [C] zu Cytosin-Sulfonat [C-SO₃], welches anschließend zu Uracil-Sulfonat [U-SO₃] desaminiert und letztendlich durch Desulfonierung in Uracil [U] überführt wird (Step 3).

Die DNA-Bisulfitkonversion erfolgte mit dem EpiTect Bisulfit Kit der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers. Pro Ansatz wurde 1 µg DNA konvertiert.

Zur Durchführung wurden je Ansatz zu ca. 1 µg DNA in 20 µl RNase-freiem H₂O 85 µl Bisulfit Mix und 35 µl DNA-Protect-Buffer hinzugegeben und anschließend nach folgendem Protokoll im Thermocycler (Biometra T3000) inkubiert:

<u>Schritt</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>
Denaturierung	5 min	95°C
Inkubation	25 min	60°C
Denaturierung	5 min	95°C
Inkubation	85 min	60°C
Denaturierung	5 min	95°C
Inkubation	175 min	60°C
Pause	∞	20°C

Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung der konvertierten DNA im 96-Well-Format. Die Proben wurden dazu kurz abzentrifugiert und jeder Ansatz mit je 560 µl BL-Puffer auf die Säulen der 96-Well-Platte gegeben und mit der Pipette kurz gemischt. Durch Anlegen des Vakuums wurde die gesamte Flüssigkeit durch die Membran gesogen.

Nun wurden zu jedem Ansatz 500 µl BW-Puffer zugefügt und mittels Vakuum ebenfalls durch die Membran gesogen und nach Hinzufügen von 250 µl BD-Puffer für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der Inhalt wieder mittels Vakuum abgesaugt und die Membran noch zweimal mit je 500 µl BW-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 250 µl Ethanol zu jeder Probe pipettiert und mit maximalem Vakuum durch die Membran gesogen. Das Vakuum blieb für 10 min angelegt, um die Membranen zu trocknen. Nachdem die Eluierungsplatte unter der 96-Well-Platte platziert wurde, wurde nach Zugabe von 70 µl EB-Puffer und 10 µl Top Elute Fluid in jeden Well für 1 min das maximale Vakuum angelegt und somit die aufgereinigte DNA in die Eluierungsplatte überführt. Diese konnte nun zur weiteren Aufbewahrung in 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert werden.

2.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerasekettenreaktion können spezifische Abschnitte eines DNA-Stranges vervielfältigt werden. Zunächst wird dazu die DNA im Thermocycler denaturiert und so in Einzelstränge aufgespalten, anschließend können synthetische Primer an die komplementären Einzelstränge binden und durch eine hitzestabile DNA-Polymerase mit den entsprechenden Nukleotiden verlängert werden. Dieser Zyklus wird mehrfach durchlaufen, wobei sich die Anzahl des zwischen den beiden gegenläufigen Primern liegenden DNA-Abschnittes exponentiell amplifiziert.

Die Amplifizierung der bisulfitkonvertierten DNA erfolgte je nach Genort mit Assay-spezifischen Primern (siehe Tab. 5, S. 16) sowie optimierten Reaktionsansätzen und Thermocycler-Protokollen. Die Assays wurden zuvor im Rahmen einer Diplomarbeit (Haake, 2009) erstellt. Die verwendeten Reaktionsansätze und Thermocyclerbedingungen sind im Anhang (Tab. 13, S. 66) tabellarisch aufgelistet.

Im Anschluss erfolgte zur Kontrolle der PCR-Produkte die Auftrennung mittels Gelelektrophorese in einem 2 %igem Agarosegel. Hierzu wurden ca. 4,5 µl des PCR-Produkts mit 3,5 µl Ladepuffer versetzt und mit einem 100 bp Längenstandard auf die Taschen des Gels (siehe 2.2.2) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von etwa 200 V und einer Laufzeit von etwa einer Stunde. Danach wurde

das Gel unter UV-Licht mit dem BioDoc Analyzer und der BioDoc Software Version 2.1 dokumentiert.

2.3.4 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung ist eine quantitative Methode, die es ermöglicht, den Methylierungszustand der analysierten CpGs zu ermitteln. Das Prinzip beruht auf der Detektion eines Lichtsignals, das unter Beteiligung verschiedener Enzyme aus bei der DNA-Synthese gebildetem Pyrophosphat entsteht. Durch Einfügen des passenden Nukleotids durch die DNA-Polymerase in den synthetisierten DNA-Strang wird in einer enzymatischen Kaskade Pyrophosphat freigesetzt. Dieses wird enzymatisch durch die Sulfurylase zu ATP konvertiert, welches eine Lichtreaktion bewirkt. Das Lichtsignal wird detektiert und erscheint als Peak im Pyrogramm (siehe Abb. 4). Hieraus kann über eine spezielle Software der Methylierungszustand der CpGs ermittelt werden. Überschüssige, nicht-eingefügte Nukleotide werden durch das Enzym Apyrase abgebaut.

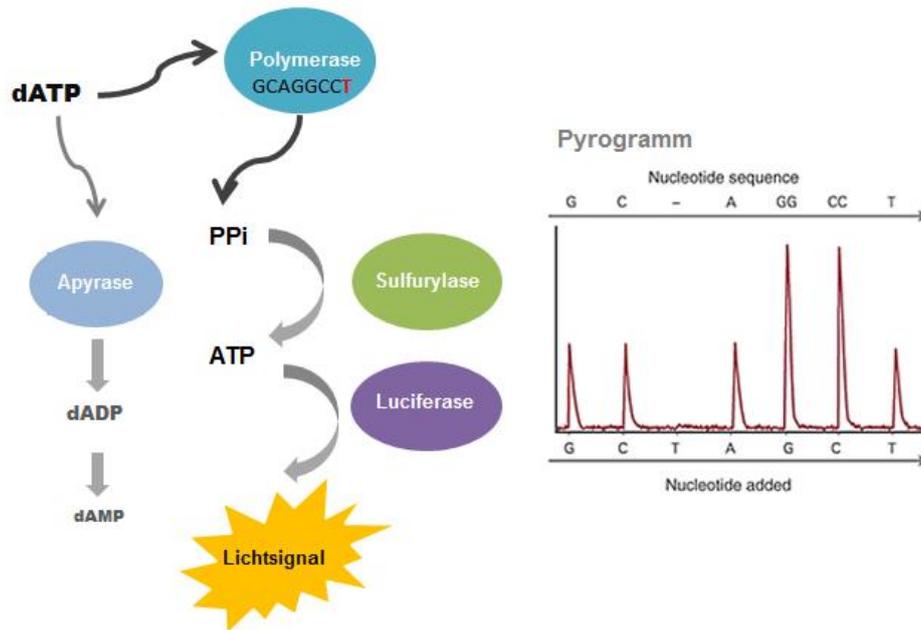


Abbildung 4: Prinzip der Pyrosequenzierung (modifiziert nach England & Pettersson 2005).

Schematische Darstellung der Pyrosequenzierung. Nach Zugabe des einzubauenden Nucleotids (hier dATP = Thymin) wird beim Nucleotideinbau Pyrophosphat (PPi) freigesetzt. Dieses wird enzymatisch durch die Sulfurylase zu ATP konvertiert und bewirkt eine Lichtreaktion, die detektiert wird und als Peak im Pyrogramm erscheint. Die Stärke des Lichtsignals und die Höhe des Peaks sind proportional zur eingebauten Menge an Nucleotid. Überschüssiges Nucleotid wird durch die Apyrase abgebaut.

Nach Bisulfitkonvertierung und PCR-Amplifikation wurden die PCR-Produkte über die VacuumPrep Workstation aufgereinigt. Dazu wurden die PCR-Produkte auf eine 96-Well-Platte übertragen und mit je 40 µl Aqua dest. aufgefüllt. Pro Well wurden anschließend 5 µl Streptavidin Sepharose Beads und 40 µl Bindungspuffer hinzu gegeben, die Platte mit einer Klebefolie abgedichtet und für ca. 10 min auf dem Plattenschüttler geschüttelt. In der Zwischenzeit wurde die Sequenzierplatte vorbereitet. Dazu wurden in jedes Well 40 µl Annealing-Puffer und der Assay-spezifische Sequenzierprimer vorgelegt. Dann wurde die Platte auf die Workstation platziert. Die PCR-Platte wurde vom Schüttler genommen und neben die Sequenzierplatte auf die Workstation gestellt. Das Vakuum wurde angeschaltet und das PrepTool zunächst mit Aqua dest. gereinigt. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte aufgenommen, mit 70 %igem Ethanol gewaschen, in 0,2 M NaOH-Lösung denaturiert und anschließend mit Waschpuffer gewaschen. Das PrepTool wurde nun über der Sequenzierplatte platziert, das Vakuum abgeschaltet und so die gereinigten

PCR-Produkte auf die Sequenzierplatte übertragen. Jetzt wurde die Platte zur Hybridisierung des Sequenzierungsprimers bei etwa 85 °C für 2 min auf die vorgeheizte Heizplatte gesetzt.

Die benötigten Mengen an Enzym- und Substratmix sowie Nukleotiden wurden über die zugehörige Software errechnet und in die hierfür vorgesehene Kartusche gefüllt. Die befüllte Kartusche und die Sequenzierplatte wurden dann in den vorgesehenen Plätzen des PyroMark ID positioniert und die Analyse gestartet.

Die Auswertung der Pyrogramme (siehe Abb. 5) erfolgte durch Mitarbeiter des Instituts mit der Methylierungssoftware Version 3.4 (Biotage). Für auswertbare Proben wurden anschließend die Methylierungswerte der einzelnen CpGs zur weiteren Auswertung in das Programm Excel von Microsoft überführt. Die Daten des Patientenkollektivs wurden mittels eines zweiseitigen t-Tests für ungepaarte Proben mit Hilfe der Software GraphPad Prism mit denen des Kontrollkollektivs verglichen und die einzelnen Proben auf eine Hypo-/Hypermethylierung untersucht (siehe 2.4).

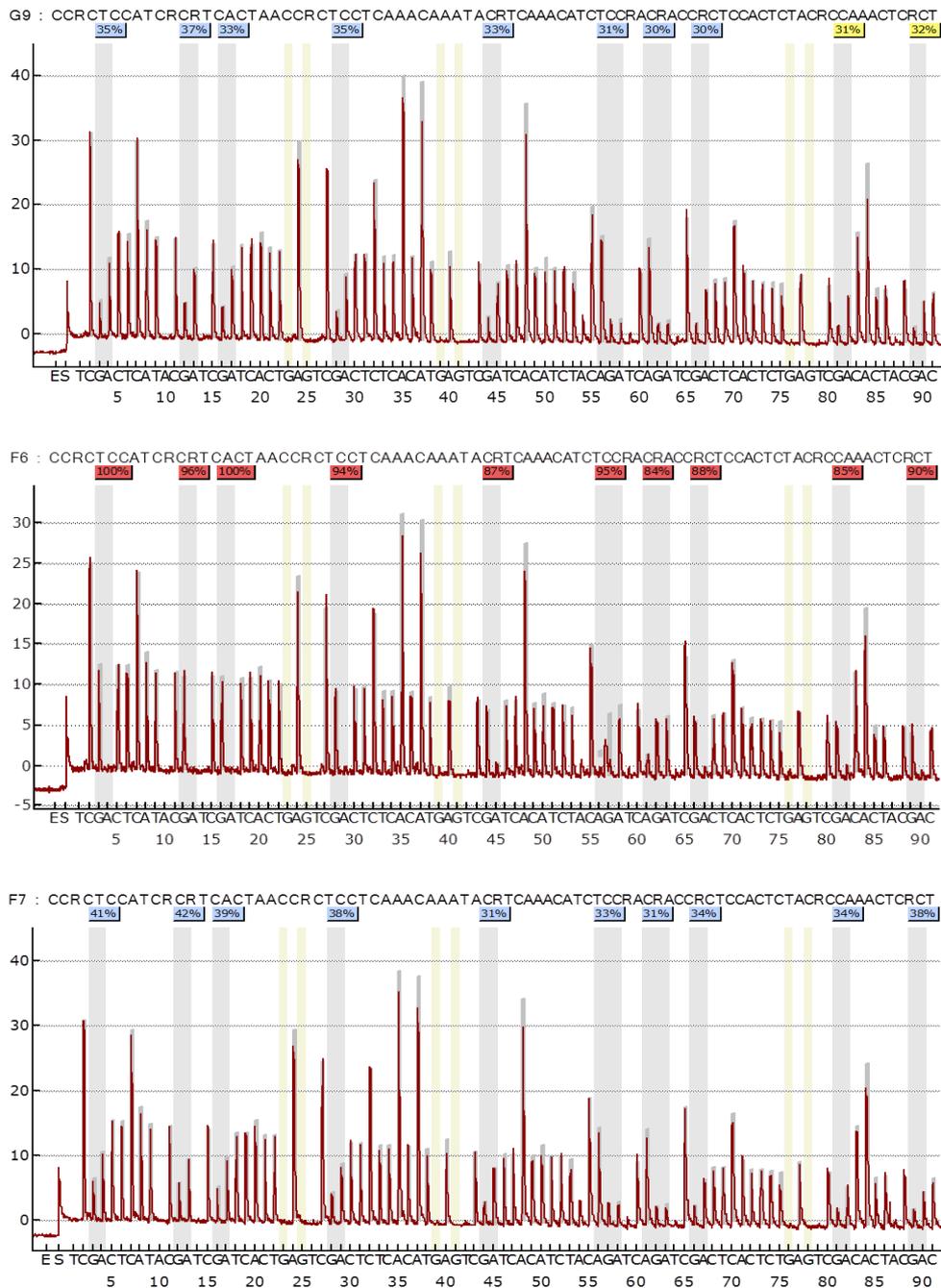


Abbildung 5: Pyrogramme des Genortes SNRPN. a) des Pools, b) der Methylierten Kontrolle (MK), c) einer Patientenprobe

Gezeigt sind Pyrogramme der Analyse des Genortes SNRPN. Die durch die enzymatische Reaktion generierten Lichtsignale erscheinen als Peaks im Pyrogramm, die Peakhöhe korreliert mit der Anzahl eingebauter Nukleotide. Oberhalb der Graphiken der einzelnen Pyrogramme befindet sich jeweils die zu analysierende Sequenz. Die Sequenz unterhalb der Graphik zeigt die nacheinander hinzugegebenen Nukleotide. Die grauen Regionen heben analysierte C/T-Sites hervor, die Prozentzahlen geben den Methylierungsgrad des betreffenden CpG-Dinukleotide an. Pyrogramm b) zeigt, dass die methylierte Kontrolle (MK) deutlich höhere Methylierungswerte aufweist.

2.3.5 SNP-Array

Des Weiteren wurde bei einer Patientin mit Auffälligkeiten in der Methylierungsanalyse ein SNP-Mikroarray durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Methode, mit der genomweit submikroskopische Chromosomenveränderungen nachgewiesen werden können und so chromosomale Imbalancen erfasst werden können.

Die Ausführung erfolgte durch Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik nach Standardmethoden und soll in dieser Arbeit deshalb nicht näher erläutert werden.

2.4 Auswertung der Bisulfit-Pyrosequenzierung

Zunächst wurden die Ergebnisse der Methylierungsanalysen der Patientengruppe mit denen der Kontrollgruppe verglichen. Um zu untersuchen, ob sich die Mittelwerte beider Gruppen systematisch voneinander unterscheiden, wurde für jeden einzelnen Genort ein zweiseitiger t-Test für ungepaarte Proben durchgeführt. Die Berechnungen wurden mit der Software GraphPad Prism Version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Dabei wurde der sogenannte P-Wert ermittelt, der als Maß für die Signifikanz eines Unterschiedes zwischen beiden Gruppen dient. Der P-Wert wurde nach Bonferroni für multiples Testen korrigiert, hierzu wurde das α -Niveau (0,05) durch die Anzahl der durchgeführten Tests ($n=11$) dividiert. Damit spricht ein P-Wert $<0,0045$ ($0,05/11$) für einen signifikanten Unterschied.

In einem weiteren Ansatz wurde eine individuelle Analyse der Einzelproben durchgeführt. Hierfür musste zunächst für alle Genorte ein Normalbereich der Methylierung basierend auf den Ergebnissen der gesamten Kontrollkohorte ermittelt werden. Dazu wurde der Methylierungsmittelwert gemittelt über alle analysierten CpGs (MW) für jede einzelne Kontrollprobe für jeden spezifischen Genort errechnet. Anschließend wurde der Gesamtmittelwert der Kontrollgruppe und dessen Standardabweichung (SD) aus den 50 Methylierungsmittelwerten der Einzelproben bestimmt. Die Grenzen des Normalbereichs wurden auf ± 3 SD vom Gesamtmittelwert festgesetzt. Methylierungswerte oberhalb des Normalbereichs wurden als hypermethyliert, Werte unterhalb des Normalbereiches als hypomethyliert

definiert. Eine Hyper-/ Hypomethylierung einer Patientenprobe lag vor, wenn der Mittelwert aller analysierten CpGs im Vergleich zu dem spezifischen Normalbereich ermittelt aus dem Kontrollkollektiv eines Genortes hyper-/ hypomethyliert waren. In diesem Fall wurde für die betreffende Patientenprobe nach demselben Prinzip bestimmt, ob die Methylierungswerte der einzelnen getesteten CpGs außerhalb von ± 3 SD des gemittelten Methylierungswertes der gesamten Kontrollgruppe desselben CpGs lagen. Die Ergebnisse jeder Patientenprobe wurden mit den ermittelten Grenzwerten verglichen und auf eine Hyper-/ Hypomethylierung jedes Genortes hin untersucht. Die Ermittlung von Mittelwerten, Standardabweichungen und Grenzen für eine Hypo- bzw. Hypermethylierung erfolgte über Microsoft Excel.

Da bei dem Genort *IGF2R* bei einigen Kontrollen sehr hohe Methylierungswerte auffielen und in der aktuellen Literatur auch Hypermethylierungen des Genortes innerhalb von Kontrollkohorten beschrieben wurden (Poole et al. 2010; Turner et al. 2010), musste hier die Berechnung des Bereiches der normalen Methylierung entsprechend modifiziert werden. Zunächst wurde ein oberer Grenzwert berechnet. Dazu wurde der Methylierungsmittelwert der mitgeführten Positivkontrollen (methylierten Kontrollen (MK)) bestimmt und anschließend der obere Grenzwert als -3 SD vom Gesamtmittelwert der MK festgelegt. Innerhalb der Kontrollkohorte lagen zwei der 50 Kontrollen oberhalb dieses Grenzwertes. Diese wurden aus den weiteren Berechnungen für die Ermittlung eines Normalbereiches der Methylierung für *IGF2R* ausgeschlossen und der Normalbereich von ± 3 SD vom Mittelwert anhand der verbliebenen 48 Kontrollen errechnet.

Bei dem Genort *H19_6CTCF* wiesen die Ergebnisse der Methylierungsanalyse eine starke Heterogenität auf. Aufgrund dessen fiel die Berechnung der unteren Grenze des Normalbereiches (-3 SD vom Mittelwert) in den negativen Bereich, sodass eine Hypomethylierung des Genortes formal nach dem angewandten statistischen Vorgehen zur Auswertung der Methylierungsdaten nicht detektiert werden konnte.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, SGA-geborene Kinder auf Störungen des genomischen Imprinting zu untersuchen. Dazu wurde die DNA-Methylierung von 50 SGA-geborenen Kindern an den 11 elterlich geprägten Genorten *DIRAS3*, *PLAGL1*, *IGF2R*, *MEST*, *IGF2*, *H19*, *MEG3*, *SNRPN*, *NDN*, *NESP* und *NESPAS* mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung untersucht und mit den Ergebnissen von 50 gesunden Kontrollprobanden verglichen. Nach Bisulfitkonvertierung wurden die zu untersuchenden Genabschnitte mittels PCR amplifiziert und mittels Pyrosequenzierung auf ihre DNA-Methylierung hin analysiert.

3.1 Vorliegen maternaler Einflussfaktoren innerhalb der SGA-Gruppe

Mittels Fragebogen wurden Angaben zu mütterliche Faktoren erhoben, die Einfluss auf die pränatale Entwicklung haben. Tab. 7 zeigt einige ausgewählte relevante maternale Faktoren und deren Häufigkeit innerhalb der untersuchten SGA-Gruppe. Eine Plazentainsuffizienz lag bei 30% der Patienten in dieser Arbeit vor. 24% der Mütter gaben an, während der Schwangerschaft geraucht zu haben. Bei 8% lag eine EPH-Gestose vor, bei jeweils einem Patienten wurde ein mütterlicher Alkoholkonsum bzw. ein Gestationsdiabetes angegeben.

Tabelle 7: Charakterisierung maternaler Faktoren mit potentiellm Einfluss auf die pränatale Entwicklung innerhalb der SGA-Gruppe (n=50)

Faktor	Ja	Nein	Nicht bekannt
Nikotinkonsum während der Schwangerschaft	12	34	4
Alkoholkonsum während der Schwangerschaft	1	43	6
Gestationsdiabetes	1	5	44
EPH-Gestose	4	32	14
Plazentainsuffizienz	15	20	15

Auflistung einiger Faktoren mit Einfluss auf die pränatale Entwicklung und deren Häufigkeit innerhalb der untersuchten Patientenkohorte. EPH-Gestose = edema-proteinuria-hypertension gestosis.

3.2 DNA-Methylierungsanalyse bekannter elterlich geprägter Genorte

Die Ergebnisse der DNA-Methylierungsanalyse der 11 untersuchten elterlich geprägten Genorte werden in diesem Abschnitt vorgestellt.

3.2.1 Auswertung der Bisulfit-Pyrosequenzierung

Die Auswertung der Ergebnisse der Methylierungsanalysen erfolgte wie unter 2.4 beschrieben. Es wurde zunächst ein Gruppenvergleich mittels zweiseitigem t-Test für ungepaarte Proben durchgeführt, um die Gruppen auf einen signifikanten Unterschied zu untersuchen. Anschließend erfolgte eine individuelle Analyse der Einzelproben. Der Genort *IGF2R* wurde hierbei gesondert behandelt (siehe 2.4).

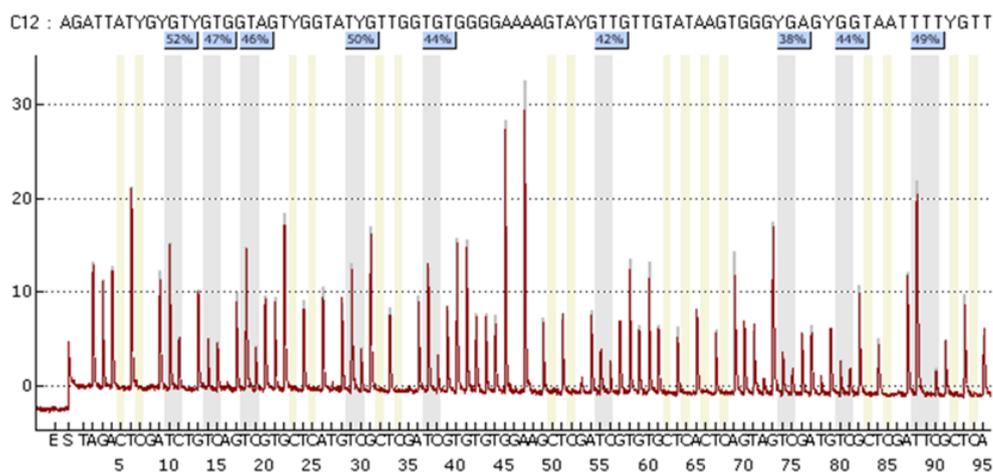


Abbildung 6: Beispiel eines Pyrogramms des Genortes *DIRAS3* (Patientenprobe)

Gezeigt ist beispielhaft ein Pyrogramm der Analyse des Genortes *DIRAS3*. Die durch die enzymatische Reaktion generierten Lichtsignale erscheinen als Peaks im Pyrogramm, die Peakhöhe korreliert mit der Anzahl eingebauter Nucleotide. Oberhalb ist die zu analysierende Sequenz, unterhalb die nacheinander hinzugegebenen Nucleotide aufgeführt. Die grauen Regionen heben analysierte C/T-Sites hervor, die Prozentzahlen geben den Methylierungsgrad des betreffenden CpG-Dinukleotide an.

3.2.2 Genort *DIRAS3* auf Chromosom 1

Der Genort *DIRAS3* (*ARHI*) liegt in der chromosomalen Region 1q31. *DIRAS3* gehört zu der Familie der Ras-Gene, die in die Regulation von Proteinen eingreifen, die Zellwachstum und -reifung kontrollieren (Yu et al. 2003). *DIRAS3* supprimiert das

Zellwachstum und übernimmt damit die Funktion eines Tumorsuppressorgens (Yu et al. 2003). Es ist maternal methyliert und wird vom paternalen Allel exprimiert (Yu et al. 2003).

Bei der Analyse der Methylierungswerte des Genortes fand sich im Gruppenvergleich eine signifikante Abweichung der Patientengruppe von der Kontrollgruppe (P-Wert <0,0001, t-Test). Die Methylierungsmittelwerte der Patientengruppe lagen im Bereich von 38,1-53,6% (Gesamtmittelwert 44,1%), während die Kontrollgruppe Methylierungsmittelwerte von 40,2-70,6% (Gesamtmittelwert 52,3%) aufwies. Das Ergebnis weist also auf eine geringere Methylierung der Patienten- gegenüber der Kontrollkohorte hin (siehe Abb. 7).

Die Individualauswertung der Einzelproben zeigte sich, dass die Methylierungswerte aller Patienten und Kontrollen innerhalb des ermittelten Normalbereiches lagen (siehe Abb. 8).

Obwohl sich also die Gesamtergebnisse beider Gruppen signifikant voneinander unterscheiden, liegen alle Einzelproben für sich betrachtet innerhalb des Normalbereiches. Eine Hypomethylierung einer einzelnen Patientenprobe zeigte sich trotz der signifikant geringeren Methylierungswerte der Gesamtergebnisse der Patientengruppe nicht.

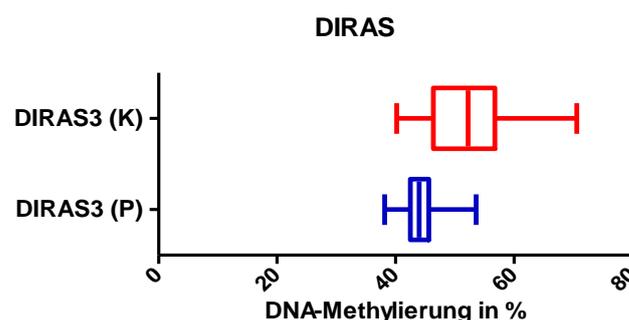


Abbildung 7: Ergebnisse der Methylierungsanalyse des Genortes DIRAS3

Graphische Darstellung der Methylierungswerte beider Gruppen gemittelt über alle analysierten CpGs in einem Box-Whiskers-Plot. Kontrollgruppe (K)= rot, Patientengruppe (P) = blau. Die Enden der Box markieren die 25./ 75. Perzentile, die Mittellinie den Median der Methylierung. Die Whiskers zeigen die minimale/ maximale Methylierung an.

3.2.4 Genort *IGF2R* auf Chromosom 6

Der Genort *IGF2R* befindet sich in der chromosomalen Region 6q25. Er codiert für den IGF2-Rezeptor, der v.a. fetal exprimiert wird und dem vornehmlich eine antiproliferative Funktion zugeschrieben wird (Braulke 1999).

Bei der Methylierungsanalyse des *IGF2R*-Genortes ergab der Gruppenvergleich einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe (P-Wert < 0,0001, t-Test), der auf eine signifikant geringere Methylierung innerhalb der Patientenkohorte hinwies (siehe Abb. 11).

In der Individualauswertung zeigten drei der 50 untersuchten SGA-geborenen Patienten mittlere Methylierungswerte, die oberhalb des berechneten Normalbereiches lagen (siehe Abb. 12). Sie wiesen jeweils eine Hypermethylierung von 4 bis 6 der 6 analysierten CpGs auf. Alle anderen 47 SGA-geborenen Patienten lagen mit Methylierungsmittelwerten von 38,9-57,1% (Gesamtmittelwert 46,1%) im Normalbereich. Auch im Kontrollkollektiv konnten zusätzlich zu den zwei Kontrollen, die bereits initial Methylierungswerte oberhalb des oberen Grenzwertes der Normalmethylierung aufwiesen (siehe 2.4), drei weitere Individuen mit einer Hypermethylierung des Genortes identifiziert werden (Mittelwert Kontrollgruppe 52,5% Methylierung). Insgesamt wiesen somit fünf Kontrollproben eine Hypermethylierung auf.

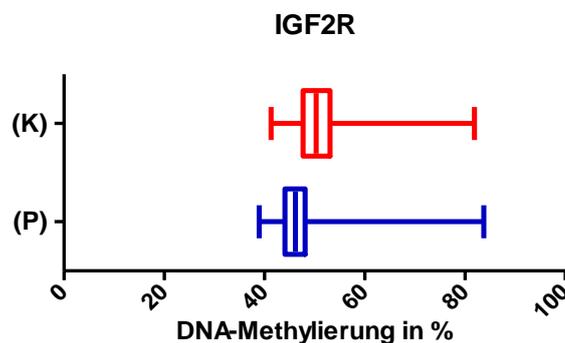


Abbildung 11: Ergebnisse der Methylierungsanalysen der Genorte *IGF2R*

Graphische Darstellung der Methylierungswerte beider Gruppen gemittelt über alle analysierten CpGs in einem Box-Whiskers-Plot. Kontrollgruppe (K)= rot, Patientengruppe (P) = blau. Die Enden der Box markieren die 25./ 75. Perzentile, die Mittellinie den Median der Methylierung. Die Whiskers zeigen die minimale/ maximale Methylierung an.

(Gesamtmittelwert 33,7%), die Kontrollgruppe zeigte Werte von 23,8-44,1% (Gesamtmittelwert 30,9%) (siehe Abb. 13).

In der individuellen Auswertung der Einzelproben befanden sich die Methylierungswerte aller Individuen innerhalb des ermittelten Normalbereiches (siehe Abb. 14).

Trotz des Unterschiedes im Gruppenvergleich, in dem die Patientengruppe signifikant höhere Methylierungswerte aufwies als die Kontrollkohorte, zeigte sich bei keiner Patientenprobe eine Hypermethylierung des Genortes. Somit unterscheiden sich zwar die Gesamtergebnisse beider Gruppen signifikant voneinander, die einzelnen Proben für sich betrachtet lagen aber noch im Bereich der Normalmethylierung.

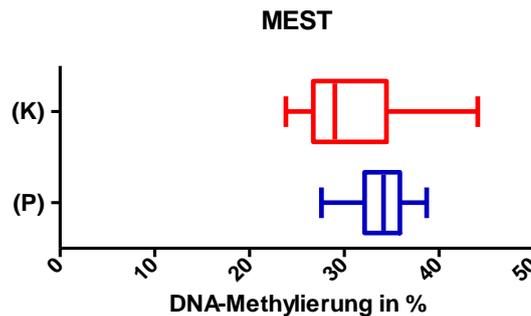


Abbildung 13: Ergebnisse der Methylierungsanalyse des Genortes MEST

Graphische Darstellung der Methylierungswerte beider Gruppen gemittelt über alle analysierten CpGs in einem Box-Whiskers-Plot. Kontrollgruppe (K)= rot, Patientengruppe (P) = blau. Die Enden der Box markieren die 25./ 75. Perzentile, die Mittellinie den Median der Methylierung. Die Whiskers zeigen die minimale/ maximale Methylierung an.

In der Individualauswertung von *IGF2* zeigte keiner der Patienten oder Kontrollprobanden eine Hypo-/ Hypermethylierung (siehe Abb. 16 A).

Der analysierte Genort *H19* umfasste neun CpGs. Hier lagen die mittleren Methylierungswerte der SGA-geborenen Patienten zwischen 7,8-33,2% (Gesamtmittelwert 22,4%), die der Kontrollgruppe zwischen 4,1-43,7% (Gesamtmittelwert 25,7%). Der Gruppenvergleich zeigte keinen signifikanten Unterschied (P- Wert 0,0412, t-Test) (siehe Abb. 15 B).

Bei der individuellen Auswertung der Einzelproben konnte aufgrund der starken Heterogenität der Ergebnisse der Methylierungsanalysen keine Untergrenze des Normalbereiches für den Genort *H19* berechnet werden. Eine Hypomethylierung konnte also nicht detektiert werden. Keine der Einzelproben zeigte eine Hypermethylierung des Genortes (siehe Abb. 16 B).

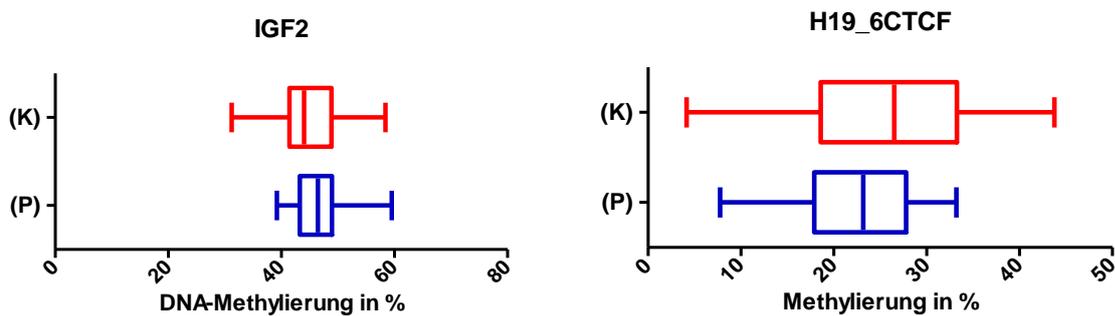


Abbildung 15: Ergebnisse der Methylierungsanalysen der Genorte A) *IGF2* und B) *H19*
Graphische Darstellung der Methylierungswerte beider Gruppen gemittelt über alle analysierten CpGs in einem Box-Whiskers-Plot. Kontrollgruppe (K)= rot, Patientengruppe (P) = blau. Die Enden der Box markieren die 25./ 75. Perzentile, die Mittellinie den Median der Methylierung. Die Whiskers zeigen die minimale/ maximale Methylierung an.

IGF2_11p15					H19_6CTCF_11p15												
SGA-Patienten	MW	CpG 4	CpG 5	CpG 6	SGA-Patienten	MW	CpG 9	CpG 10	CpG 11	CpG 12	CpG 13	CpG 14	CpG 15	CpG 16	CpG 17		

Abbildung 16: Darstellung der Individualauswertung der Genorte A) IGF2 und B) H19 Ergebnisse der Pyrosequenzierung der SGA-geborenen Patientengruppe. Die erste Spalte eines Genortes zeigt den Mittelwert einer Probe, jede weitere Spalte steht für ein einzelnes CpG-Dinukleotid. Jede Zeile stellt eine analysierte Probe dar. Grau = Methylierungswert innerhalb des Normalbereiches, rot = Hypermethylierung, grün = Hypomethylierung.

3.2.7 Genort MEG3 auf Chromosom 14

Auf Chromosom 14q32 befindet sich der Genort *MEG3* (auch *GTL2* bezeichnet). Mit dem benachbarten Gen *DLK1* liegt *MEG3* innerhalb eines Clusters mit weiteren geprägten Genen unter Kontrolle der intergenetischen, paternal-methylierten DMR (IG-DMR) und der *MEG3*-DMR im Promotorbereich (Geuns et al. 2007). Methylierungsverluste dieser Region führen zu einem Phänotyp ähnlich der maternalen UPD 14 (Temple-Syndrom), charakteristischer ist ein intrauteriner Kleinwuchs (Temple et al. 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *MEG3*-DMR auf Methylierungsstörungen einbezogen untersucht. Die Analyse ergab mittlere Methylierungswerte von 11,7-47,8% (Gesamtmittelwert 38,5%) in der Patientengruppe und 27,4-52,5% (Gesamtmittelwert 39,5%) in der Kontrollgruppe. Während sich insgesamt zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied zeigte (P-Wert 0,3645, t-Test) (siehe Abb. 17), fiel in der Individualauswertung der Einzelproben eine SGA-geborene

Patientin deutlich aus dem berechneten Normalbereich heraus und zeigte eine Hypomethylierung aller analysierten CpGs (siehe Abb. 18). Der mittlere Methylierungswert lag bei dieser Patientin (Klru280204) bei 12% und somit deutlich unterhalb des Normalbereiches von -3 SD vom MW (20,1-56,3%), sodass der Verdacht auf das Vorliegen eines Temple Syndroms gestellt wurde (siehe Abb. 19).

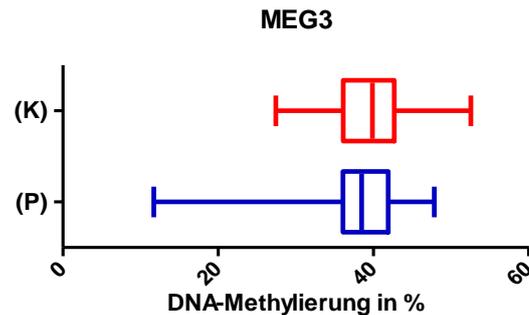


Abbildung 17: Ergebnisse der Methylierungsanalyse des Genortes MEG3

Graphische Darstellung der Methylierungswerte beider Gruppen gemittelt über alle analysierten CpGs in einem Box-Whiskers-Plot. Kontrollgruppe (K)= rot, Patientengruppe (P) = blau. Die Enden der Box markieren die 25./ 75. Perzentile, die Mittellinie den Median der Methylierung. Die Whiskers zeigen die minimale/ maximale Methylierung an.

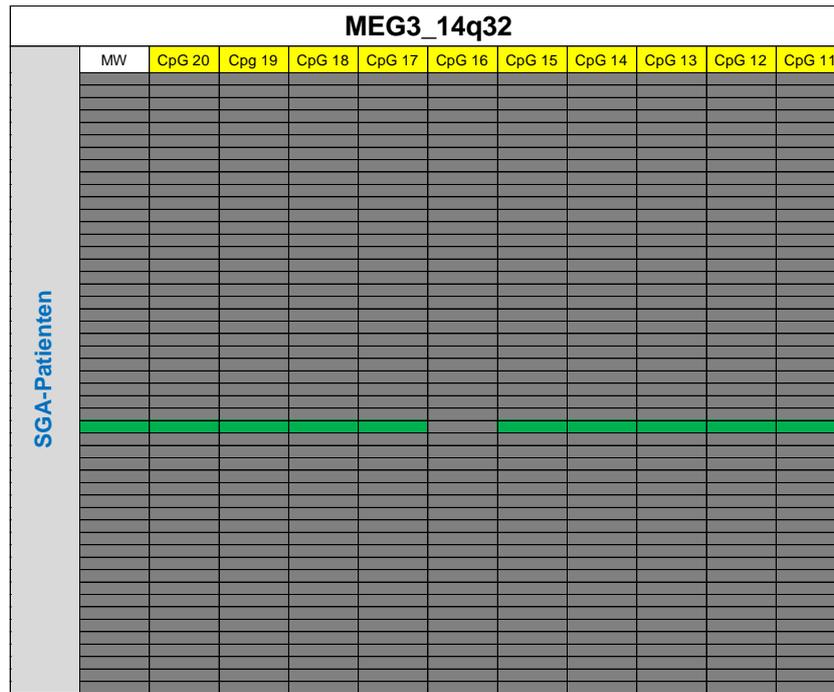


Abbildung 18: Darstellung der Individualauswertung des Genortes MEG3

Ergebnisse der Pyrosequenzierung der SGA-geborenen Patientengruppe. Die erste Spalte eines Genortes zeigt den Mittelwert einer Probe, jede weitere Spalte steht für ein einzelnes CpG-Dinukleotid. Jede Zeile stellt eine analysierte Probe dar. Grau = Methylierungswert innerhalb des Normalbereiches, rot = Hypermethylierung, grün = Hypomethylierung. Eine Patientin zeigt eine Hypomethylierung des Genortes.

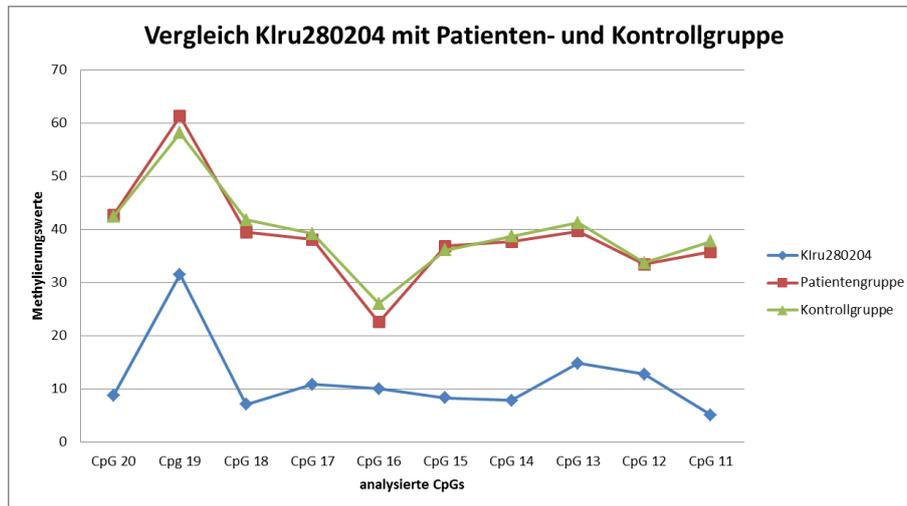


Abbildung 19: Vergleich der Methylierungswerte von MEG3

In der Abbildung sind die Methylierungswerte der einzelnen analysierten CpGs des Genortes MEG3 der Patientin Klru280204 (blau) im Vergleich zu den Mittelwerten der Patienten (rot)- und der Kontrollgruppe (grün) dargestellt. Es zeigt sich eine deutliche Abweichung der Kurve von Klru280204, bei der Patientin liegt eine Hypomethylierung des Genortes vor.

3.2.8 Genorte *SNRPN* und *NDN* auf Chromosom 15

Die chromosomale Region 15q11 beinhaltet verschiedene geprägte Gene. Funktionsverluste in diesem Bereich führen unter anderem zu den Krankheitsbildern Prader-Willi- und Angelman-Syndrom. Beide Syndrome sind zu einem geringen Anteil (PWS 1-3%, AS 2-4%) auch auf aberrantes genomisches Imprinting zurück zu führen (Buiting 2010). In der Region 15q11-q13 wurden die geprägten Genloci *SNRPN* und *NDN* auf Methylierungsstörungen untersucht.

Die Methylierungsanalyse des Genortes *SNRPN* zeigte im Gruppenvergleich keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv (P-Wert 0,6490, t-Test) (siehe Abb. 20 A). Die Methylierungswerte der Patientengruppe lagen zwischen 28,5-41,6% (Gesamtmittelwert 34%), die der Kontrollen bei 26,8-48,7% (Gesamtmittelwert 34,4%).

Auch bei der Analyse des *NDN*-Genortes wichen die Methylierungswerte beider Gruppen nicht signifikant voneinander ab (P-Wert 0,4570, t-Test) (siehe Abb. 20 B). Hier zeigten die SGA-geborenen Patienten Mittelwerte von 36,2-62,8% Methylierung (Gesamtmittelwert 47,9%), die der Kontrollgruppe lagen im Bereich von 32,2-59% (Gesamtmittelwert 47,5%).

Bei beiden Genorten lagen in der Individualauswertung alle Einzelproben der Kontroll- und der Patientengruppe innerhalb des ermittelten Normalbereiches (siehe Abb. 21).

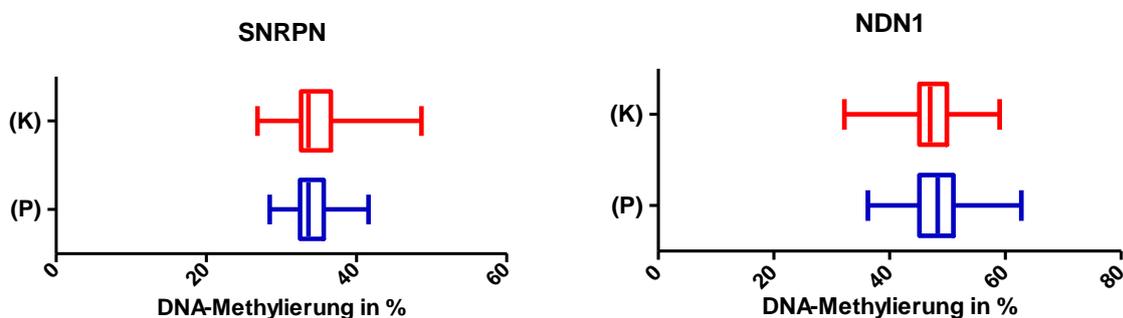


Abbildung 20: Ergebnisse der Methylierungsanalysen der Genorte A) *SNRPN*, B) *NDN*
 Graphische Darstellung der Methylierungswerte beider Gruppen gemittelt über alle analysierten CpGs in einem Box-Whiskers-Plot. Kontrollgruppe (K)= rot, Patientengruppe (P) = blau. Die Enden der Box markieren die 25./ 75. Perzentile, die Mittellinie den Median der Methylierung. Die Whiskers zeigen die minimale/ maximale Methylierung an.

3.3 Weiterführende Analyse bei Verdacht auf Temple-Syndrom

Wie unter 3.2.7 beschrieben zeigte die Patientin Klu280204 mit einer Abweichung von mehr als -3 SD vom MW der Kontrollgruppe eine signifikante Hypomethylierung des Genortes *MEG3* in der chromosomalen Region 14q32, sodass der Verdacht auf ein Temple-Syndrom gestellt wurde.

Die Methylierungsanalyse der 10 weiteren in diese Arbeit einbezogenen Genorte stellte sich bei Klu280204 mit Werten im jeweiligen Normalbereich unauffällig dar.

Im Vorfeld war bereits eine Chromosomenanalyse bei der Patientin durchgeführt worden, hier zeigte sich ein regelrechter weiblicher Chromosomensatz. Eine FISH-Untersuchung ergab keinen Anhalt für eine Mikrodeletion im Bereich der Subtelomere.

Zur Verifizierung der nachgewiesenen Hypomethylierung wurde Probenmaterial der Patientin an das Institut für Humangenetik in Essen versandt. Bei der Untersuchung des *MEG3* (*GTL2*)-Promotors der chromosomalen Region 14q32 sowie des IG-DMR am *DLK1/MEG3*-Locus mittels Methylierungs-spezifischer PCR (MS-PCR) konnte nur die Bande für das unmethylierte Allel nachgewiesen werden. Weiterhin wurde im gleichen Institut eine Mikrosatellitenanalyse mit Markern für Chromosom 14 an der DNA von Klu280204 und beiden Elternteilen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass eine biparentale Vererbung des Chromosoms 14 vorlag. Eine maternale UPD 14 konnte damit weitestgehend ausgeschlossen werden.

Um eine unbalancierte Chromosomenveränderung unter Beteiligung des *MEG3*-Gens auszuschließen, wurde in unserem Institut eine SNP-Array-Untersuchung an DNA von Klu280204 durchgeführt. Diese stellte sich für den relevanten Bereich des *MEG3*-Gens auf 14q32.3 einschließlich der für die Regulation der Expression verantwortlichen Regionen unauffällig dar.

Somit sprechen alle vorliegenden Ergebnisse (siehe Tab. 8) für das Vorliegen einer Epimutation als Ursache der *MEG3*-Hypomethylierung. Eine maternale UPD 14 und eine paternale Deletion des Bereiches 14q32 konnte weitestgehend ausgeschlossen werden.

Tabelle 8: Übersicht über die durchgeführten Untersuchungen bei Klru280204

Diagnostik	Ergebnis
Chromosomenanalyse	Normaler weiblicher Karyotyp
FISH-Analyse	Kein Anhalt für Deletion im Subtelomerscreening
Methylierungsanalyse im Rahmen dieser Arbeit	Hypomethylierung des <i>MEG3</i> -Gens
MS-PCR (Essen)	Nur Nachweis des unmethylierten Allels
Mikrosatellitenanalyse mit Markern für Chr. 14 (Essen)	Biparentale Vererbung von Chr. 14
SNP-Array	Relevante Region 14q32.3 (<i>MEG3</i> -Gen) unauffällig
Diagnose	Temple-Syndrom (upd(14)mat-Syndrom)

3.4 Untersuchung der *IGF2R* Hypermethylierung

Wie unter 3.2.4 beschrieben, wiesen insgesamt drei der 50 SGA-geborenen Patienten eine signifikante Hypermethylierung des *IGF2R*-Genortes auf. Die mittleren Methylierungswerte lagen jeweils bei 81,6%, 82,2% und 83,7% gemittelt über alle sechs analysierten CpGs. An allen weiteren analysierten Genorten zeigten diese Patienten keine Auffälligkeiten. Auch bei fünf Individuen der Kontrollkohorte konnte eine Hypermethylierung des *IGF2R*-Genortes detektiert werden.

Zum Vergleich wurde auch bei den Eltern der Patienten eine Methylierungsanalyse des *IGF2R*-Genortes durchgeführt. Hierbei zeigte der Vater eines Patienten mit *IGF2R*-Hypermethylierung ebenfalls eine Hypermethylierung von 81,2%, alle anderen Elternteile der Kinder mit *IGF2R*-Hypermethylierung wiesen normale Methylierungswerte auf (siehe Tab. 9).

Tabelle 9: Übersicht über mittlere Methylierungswerte der Patienten mit *IGF2R*-Hypermethylierung sowie der dazugehörigen Eltern

Patient	Mittlere Methylierung <i>IGF2R</i>	Mittlere Methylierungswerte der Eltern	Weitere Befunde
Klci140795	81,6%	Mutter: 49,9% Vater: 81,2%	Keine Auffälligkeiten an anderen analysierten Genorten
Klne180499	82,2%	Mutter: 48,5% Vater: n. a.	Keine Auffälligkeiten an anderen analysierten Genorten
Klvs280700	83,7%	Mutter: 55,9% Vater: 50,2%	Heterozygote <i>IGF1</i> -Mutation

n. a.: nicht analysiert, da kein Material vorliegend

Bei Patient Klvs280700 war vorbefundlich neben der *IGF2R*-Hypermethylierung auch eine heterozygote Mutation des *IGF1*-Gens (*IGF1* Mutation c.292C>T, p.R98L) bekannt (Information aus vorliegenden Arztberichten), die jedoch laut Befundbericht zu keiner funktionellen Einschränkung des *IGF1*-Gens führt. Diese wurde ebenfalls bei der Mutter des Kindes nachgewiesen, die normale Methylierungswerte für den *IGF2R*-Genort zeigte (siehe Abb. 24).

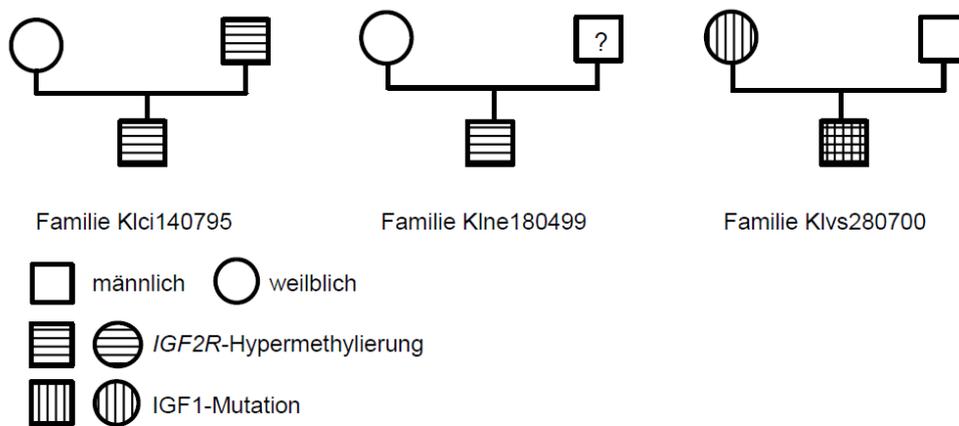


Abbildung 24: Stammbäume der Familien der Patienten mit *IGF2R*-Hypermethylierung

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend wiesen die Genorte *DIRAS3*, *IGF2R* und *MEST* im Gruppenvergleich einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe auf, im Rahmen der Einzelanalysen ergaben sich jedoch bis auf *IGF2R* keine außerhalb des Normbereichs liegenden DNA-Methylierungswerte.

Es konnten in der Individualanalyse bei insgesamt vier der 50 untersuchten SGA-geborenen Patienten Auffälligkeiten der DNA-Methylierung an je einem der 11 untersuchten Loci festgestellt werden (siehe Tab. 10). Bei drei SGA-geborenen Kindern und fünf Kontrollprobanden zeigte sich eine Hypermethylierung der *IGF2R*-Region. Bei einer Patientin konnte ein upd(14)mat Syndrom festgestellt werden.

Bei allen weiteren analysierten Genorten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppe.

Tabelle 10: Übersicht über die Ergebnisse der DNA-Methylierungsanalyse der 11 untersuchten Genorte.

Analysierter Genort	Chromosomale Region	Mittlere Methylierung SGA-geborene Patienten (50) in %	Mittlere Methylierung der Kontrollkohorte (50) in %	P-Wert (t-Test)	Hypo-/Hypermethylierung
<i>IGF2</i>	11p15.5	46,2	44,7	0,1451	
<i>H19</i>	11p15.5	22,4	25,7	0,0412	
<i>SNRPN</i>	15q11- q13	34	34,4	0,6490	
<i>NDN</i>	15q11- q13	47,9	47,5	0,4570	
<i>MEST</i>	7q13	33,7	30,9	<u>0,0002</u>	
<i>NESP</i>	20q13	37,6	38,6	0,1957	
<i>NESPAS</i>	20q13	44,6	46,7	0,0050	
<i>DIRAS3</i>	1p31	44,1	52,3	<u>< 0,0001</u>	
<i>PLAGL1</i>	6q24	32,4	32,4	0,9756	
<i>IGF2R</i>	6q25	48,2	52,5	<u>< 0,0001</u>	<u>3 Patienten mit Hypermethylierung</u>
<i>MEG3</i>	14q32	38,5	39,5	0,3645	<u>1 Patient mit Hypomethylierung</u>

4 Diskussion

4.1 Methodische Aspekte

In diesem Abschnitt werden für diese Arbeit relevante methodische Aspekte besprochen.

4.1.1 Wahl der Methoden

Die Diagnostik von Methylierungsstörungen ist erst seit Einführung methylierungsspezifischer Tests möglich. Heutzutage stehen mehrere Methoden zur Verfügung, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

4.1.1.1 Pyrosequenzierung

In dieser Arbeit wurde für die Methylierungsanalysen die Bisulfit-Pyrosequenzierung gewählt. Die Pyrosequenzierung liefert ein (semi-) quantitatives Ergebnis, da die Intensität des detektierten Lichtsignals mit der Menge an eingebautem Nukleotid korreliert. Sie ermöglicht so eine Quantifizierung des Methylierungsstatus jedes einzelnen CpGs der analysierten Sequenz (Dupont et al. 2004). Als Hochdurchsatzmethode ist die Ausführung im 96-Well-Format je Assay möglich. Weitere Vorteile der Methode liegen in der genauen und reproduzierbaren Qualität der Ergebnisse und der einfachen Handhabung (Tost & Gut 2007). In eigenen Erfahrungen mit Verdünnungsreihen verhielt sich der Methylierungsstatus jedoch nicht immer linear und zeigte sich stark abhängig von der zu analysierten Region und dem verwendeten Assay.

Die Pyrosequenzierung kann vielfältig eingesetzt werden, unter anderem wird sie zur SNP-Genotypisierung, Bakterientypisierung, Mutationsdetektion und, wie in dieser Arbeit, zur quantitativen Methylierungsanalyse von CpGs verwendet (Tost & Gut 2007). Die Pyrosequenzierung stellt ein relativ neues Verfahren dar, bei dem die Erfahrungen im Einsatz für Methylierungsanalysen von geprägten Genen und zur Diagnostik von Imprintingstörungen noch begrenzt sind. Weitere Grenzen der Methode liegen in der auf 100 bis 150 bp begrenzte Länge der analysierbaren

Sequenz und somit der möglichen Anzahl analysierbarer CpGs (Ammerpohl et al. 2009).

4.1.1.2 Alternative Methoden

Als Alternative für Methylierungsanalysen stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Den Goldstandard für spezifische DNA-Methylierungsanalysen stellt die Bisulfit-Sequenzierung dar. Die Sequenzanalyse Bisulfit-behandelter DNA ermöglicht eine Auflösung jedes einzelnen CpGs der Zielsequenz. Diese Technik ist jedoch aufwendig, zeit- und kostenintensiv und setzt vorhergehendes Klonieren der DNA voraus (Dahl & Guldborg 2003).

Die Methylierungs-spezifische PCR (MS-PCR) ist die zurzeit wohl meist verbreitete Technik. Sie ist eine ebenfalls sehr sensitive Methode, die auf der Amplifikation Bisulfit-behandelter DNA mit spezifischen Primern für sowohl methylierte als auch unmethylierte DNA basiert. Im Gegensatz zur Pyrosequenzierung besteht hierbei der Nachteil, dass ein quantitativer Nachweis der Methylierung der einzelnen CpGs nicht möglich ist. Außerdem ist die Anzahl analysierbarer CpGs limitiert und, wie auch die Pyrosequenzierung, von Qualität von Primern und Proben abhängig (Brakensiek et al. 2007).

Die Bisulfit-Pyrosequenzierung weist also gegenüber den anderen genannten Methoden einige Vorteile auf, unter anderem die Quantität der Ergebnisse und die effiziente und zuverlässige Handhabung und konnte in dieser Arbeit erfolgreich zur Methylierungsanalyse von 11 elterlich geprägten Genorten eingesetzt werden.

4.1.2 Auswahl der Genorte

Zum Screening nach Störungen der DNA-Methylierung bei SGA-geborenen Patienten wurden 11 Genorte, die dem Imprinting unterliegen, untersucht. Diese wurden ausgewählt, weil sie mit Imprintingsyndromen assoziiert oder in wachstumsregulierende Funktionen involviert sind. Mit den Genorten *PLAGL1* (TNDM), *MEST*, *IGF2*, *H19* (BWS, SRS), *MEG3* (TS), *NDN* und *SNRPN* (PWS, AS) konnten sechs bekannte Imprintingsyndrome abgedeckt werden, die mit Störungen

der Entwicklung bzw. des Wachstums assoziiert sind: TNDM (Chr. 6q24), BWS (Chr. 11p15.5), SRS (Chr. 7q32; 11p15.5), TS (Chr. 14q32), PWS und AS (Chr. 15q11-q13). Weiterhin wurde die DNA-Methylierung der Loci *NESP* und *NESPAS*, die in die Ätiologie des Pseudohypoparathyreodismus Typ Ib involviert sind, des IGF2-Rezeptors, der eine wachstumshemmende Funktion vermittelt, und des Tumorsuppressorgens *DIRAS3* untersucht. Die 11 ausgewählten Genorte decken damit die wichtigsten klinisch relevanten Imprintingstörungen ab.

4.1.3 Bewertung der Ergebnisse

In diesem Abschnitt wird auf die beiden angewandten Auswertmethoden (Gruppenvergleich und Individualauswertung) eingegangen und die damit erzielten Ergebnisse besprochen.

4.1.3.1 Gruppenvergleiche

Um zu untersuchen, ob sich die Methylierungswerte der SGA-geborenen Patienten von denen der Normalbevölkerung unterscheiden, wurden die Daten mit einer Kontrollgruppe gesunder Probanden verglichen. Da hier zwei unabhängige Stichproben untersucht wurden, bei denen von einer Normalverteilung auszugehen ist, wurde ein Zweistichproben t-Test gewählt um festzustellen, ob ein systematischer Unterschied zwischen beiden Gruppen vorliegt. Da die Richtung der Abweichung der Methylierungswerte (Hypo- oder Hypermethylierung) nicht bekannt war, wurde ein zweiseitiger t-Test verwendet. Der Zweistichproben t-Test gilt als Verfahren der Wahl für den Vergleich der Erwartungswerte zweier normalverteilter Zufallsvariablen mit gleicher Varianz (Caliebe et al. 2008). Da mehrere Paarvergleiche mit den gleichen Daten durchgeführt wurden, wurde die Alpha-Fehlerkumulierung nach Bonferroni korrigiert (Caliebe et al. 2008). Dazu wurde für das testspezifische Signifikanzniveau, das für die Prüfung der Signifikanz der Ergebnisse der einzelnen Tests verwendet wurde, das multiple Signifikanzniveau (0,05) durch die Anzahl der durchgeführten Tests ($n=11$) dividiert (siehe 2.4).

Der Vergleich von Patienten- und Kontrollgruppe mittels zweiseitigem t-Test für ungepaarte Proben ergab für die Genorte *DIRAS3*, *IGF2R* und *MEST* einen

signifikanten Unterschied. Nur bei *DIRAS3* betrug die Abweichung der Patienten- von der Kontrollgruppe mehr als 10%, wobei bei der Auswertung drei Proben der Kontrollgruppe mit sehr hohen Methylierungswerten am oberen Grenzwert des Normalbereiches auffielen. Bei den anderen zwei Genorten waren die Unterschiede mit Abweichungen von <10% nur sehr gering und höchstwahrscheinlich nicht von biologischer Relevanz. Sie sind am ehesten auf Ausreißer zurückzuführen, die nicht das Bild der Gesamtgruppe widerspiegeln und den Gruppenvergleich verfälschen. In einem zweiten Ansatz wurde daher eine individuelle Auswertung der Einzelproben vorgenommen.

Die signifikanten Ergebnisse im Gruppenvergleich sind am ehesten auf die Heterogenität der SGA-Gruppe und die Variabilität der DNA-Methylierung zurückzuführen und nicht von biologischer Relevanz.

4.1.3.2 Individualauswertung der Einzelproben

Auch als Referenz für die Individualauswertung wurde zur Ermittlung des Bereichs der Normalmethylierung eine Kontrollgruppe von 50 gesunden Probanden verwendet. Diese wurde aus fünf verschiedenen Zentren zusammengestellt, um technische Einflüsse zu korrigieren. Diese Arbeit wurde mit dem Ziel eines Screenings nach Methylierungsstörungen durchgeführt. Mit der verwendeten Methode zur Ermittlung einer Hypo- bzw. Hypermethylierung einer Patientenprobe mit einem Normalbereich von +/- 3 SD vom Mittelwert der Kontrollgruppe wurde ein restriktives Vorgehen gewählt, um eine möglichst hohe Sensitivität der richtig positiven Ergebnisse zu erhalten. Es wurde angestrebt, die Fälle mit normalem Methylierungsmuster mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von 99,7 % korrekt zu identifizieren. Bei 50 untersuchten Patienten an 11 verschiedenen Genorten wurden insgesamt etwa 550 Methylierungsanalysen durchgeführt. Unter Annahme einer Normalverteilung der DNA-Methylierungswerte wäre so zu erwarten, dass statistisch etwa 1-2 Ergebnisse falsch als hypermethyliert bzw. hypomethyliert klassifiziert wurden.

4.2 Medizinisch-biologische Aspekte

In dieser Arbeit wurden insgesamt 50 SGA-geborene Patienten auf Imprintingstörungen an 11 verschiedenen elterlich geprägten Genorten untersucht. Es konnten dabei drei Patienten mit einer Hypermethylierung des *IGF2*-Rezeptor-Genortes detektiert werden. Die Häufigkeit der *IGF2R*-Hypermethylierung liegt innerhalb der Patientenkohorte somit bei 6 % (3/50 Fällen). Außerdem wurde eine Patientin mit einer Hypomethylierung des *MEG3*-Genortes identifiziert.

Zusammenfassend wiesen insgesamt vier von 50 SGA-geborene Patienten (8%) Methylierungsveränderungen an einem einzelnen dem Imprinting unterliegenden Genort auf.

4.2.1 *H19_6CTCF*

In der DNA-Methylierungsanalyse wiesen die Ergebnisse des Genortes *H19_6CTCF* sowohl in der Kontroll- als auch in der Patientengruppe eine starke Variabilität auf. Bei der angewandten Methode zur Berechnung eines Normalbereiches fiel daher der untere Grenzwert in den negativen Bereich (Normalbereich 0-40%), sodass eine Hypomethylierung des Genortes statistisch nicht detektiert werden konnte. Das Vorliegen eines SRS als Ursache für eine SGA-Geburtlichkeit konnte damit bei den untersuchten Patienten durch das Screening nicht erfasst werden und kann demzufolge formal nicht ausgeschlossen werden.

Der größte Anteil der SRS beruht auf Epimutationen und Mutationen in der chromosomalen Region 11p15. Der *H19_CTCF*-Genort spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Expression *H19/IGF2*-Region, wobei hier insbesondere der sechsten CTCF-Bindungsstelle eine Schlüsselrolle zukommt (Takai et al. 2001). Etwa 40% der Patienten mit SRS weisen eine Hypomethylierung der *H19*-DMR auf. Der *H19*-Genort ist somit für die Diagnose des SRS von großer Bedeutung (Eggermann et al. 2010). Eine hohe Variabilität der Methylierung der *H19*-ICR1 wurde auch in anderen Studien beschrieben. So konnte Coolen et al 2011 auch in einer Zwillingsstudie eine hohe Variabilität der Methylierung der *H19*-ICR bei ein- und zweieiigen Zwillingen nachweisen (Coolen et al. 2011). Es scheint sich dabei also um ein häufiges Phänomen zu handeln, das somit nicht auf eine mangelnde Qualität des

in dieser Arbeit verwendeten Assays oder der praktischen Durchführung schließen lässt.

Aufgrund der hohen Relevanz des Genortes für die Diagnose des SRS wäre als Alternative zu *H19_6CTCF* die Untersuchung eines anderen Locus der *H19-IC1*-Region, z.B. des *H19_3CTCF*- Genortes, zu erwägen.

4.2.2 *IGF2R* Hypermethylierung

Bei drei SGA-geborenen Kindern fiel in der Methylierungsanalyse des *IGF2R*-Genortes eine signifikante Hypermethylierung der untersuchten Region auf.

IGF2 ist ein Wachstumsfaktor, dessen proliferative Effekte überwiegend über den IGF1-Rezeptor vermittelt werden (Braulke 1999). Dem IGF2-Rezeptor hingegen wird vornehmlich eine antiproliferative Funktion zugeschrieben, indem er IGF2 bindet und mittels rezeptorvermittelter Endozytose aus der Zirkulation entfernt (Braulke 1999). Der IGF2-Rezeptor wird vor allem fetal exprimiert (Braulke 1999). Turner et al stellten die Hypothese auf, dass eine Hypermethylierung der DMR2 zu einer vermehrten Expression des Rezeptors führt, wodurch die Konzentration des zirkulierenden Wachstumsfaktors IGF2 abnähme. Dies würde folglich zu einer Wachstumshemmung führen (Turner et al. 2010). Die *IGF2R*-Hypermethylierung könnte demnach mit der Symptomatik der „SGA-Geburtlichkeit“ assoziiert sein.

Eine Hypermethylierung des *IGF2R*-Genortes wurde auch in anderen Studien beschrieben. Turner et al führten 2010 Methylierungsanalysen bei 79 Patienten mit Wachstumsretardierung durch. Hier wiesen insgesamt 7 Patienten eine Hypermethylierung der *IGF2R*-Region auf, was einer signifikanten Häufung gegenüber der untersuchten Kontrollkohorte (3/267) entsprach (Turner et al. 2010). Dabei ist jedoch zu beachten, dass die untersuchte Patientengruppe Patienten mit dem Verdacht auf ein SRS mit einschloss (Turner et al. 2010). Auch Poole et al konnte im Rahmen einer Methylierungsanalyse bei 3 von 90 untersuchten Patienten eine *IGF2R*-Hypermethylierung nachweisen, konnte jedoch keine signifikante Häufung gegenüber der Kontrollgruppe feststellen (Poole et al. 2010). Hier wurden Patienten untersucht, bei denen aufgrund klinischer Auffälligkeiten eine

zytogenetische Diagnostik durchgeführt wurde und die ein negatives Array-CGH-Ergebnis aufwiesen (Poole et al. 2010).

In dieser Arbeit wurde eine Hypermethylierung des *IGF2R*-Genortes neben den drei Patienten auch bei fünf Individuen der Kontrollgruppe nachgewiesen. Damit trat die *IGF2R*-Hypermethylierung in beiden Gruppen mit ähnlicher Häufigkeit auf, es bestand im Gegensatz zu oben genannten Studien (Turner et al. 2010, Poole et al. 2010) keine signifikante Anreicherung des Befundes innerhalb der Patientengruppe. Bei der Untersuchung der Eltern der betroffenen Patienten ließ sich nur bei dem Vater von Klci140795 ebenfalls eine *IGF2R*-Hypermethylierung nachweisen. Auch die Korrelation der *IGF2R*-Hypermethylierung mit einem bestimmten Phänotyp ergab sich nicht (siehe Tab. 11). Dies führt zu der Annahme, dass es sich bei der *IGF2R*-Hypermethylierung am ehesten um einen epigenetischen Polymorphismus handelt.

Tabelle 11: Phänotyp der SGA-Patienten mit *IGF2R*-Hypermethylierung

Patient	Alter	Geschlecht	Klinische Auffälligkeiten
Klci140795	14 Jahre	männlich	Kleinwuchs, Klinodaktylie
Klne180499	10 Jahre	männlich	Faziale Dismorphiezeichen, Klinodaktylie, Leistenhernie
Klvs280700	9 Jahre	männlich	Adipositas, Kleinwuchs, rundes Gesicht, prominente Ohrläppchen, prominente Stirn Vorbefundlich bekannte het. IGF1 Mutation c.292C>T, p.R98L, auch bei der Mutter vorhanden

4.2.3 Temple-Syndrom

Die Methylierungsanalyse des Genortes *MEG3* ergab im Fall der Patientin Klru280204 eine signifikante Hypomethylierung des Genortes. Das Ergebnis wurde mittels MS-PCR bestätigt. Der maternal exprimierte Genort *MEG3* befindet sich in einem dem Imprinting unterliegenden Locus, der unter Kontrolle einer paternal methylierten IG-DMR steht (Temple 2007). Normalerweise läge *MEG3* also auf dem paternalen Allel methyliert und maternal unmethyliert vor. Eine Hypomethylierung weist so am ehesten auf den Verlust der paternalen Methylierung hin. Mittels Mikrosatellitenanalyse und SNP-Array konnten eine maternale UPD und

chromosomale Imbalancen (z.B. eine paternale Deletion) weitestgehend ausgeschlossen werden. Kleinste Chromosomenveränderungen und balancierte strukturelle Aberrationen sowie eine partielle UPD können unter Umständen durch die angewandten Methoden nicht erfasst werden. Die Untersuchungsergebnisse sprechen also dafür, dass bei Klu280204 am ehesten ein isolierter Imprintingdefekt des paternalen Allels vorliegt. Dieser führt zu einem Phänotyp ähnlich der maternalen UPD, welcher unter anderem mit einer Wachstumsretardierung einhergeht. Die vorliegende Methylierungsveränderung der Patientin wäre also mit der SGA-Geburtlichkeit und dem klinischen Phänotyp der Patientin vereinbar (siehe 4.2.3.1).

4.2.3.1 Klinischer Vergleich der Patientin Klu280204 mit dem Phänotyp des TS

Die Patientin Klu280204 kam nach spontaner Konzeption in der 38+3 Schwangerschaftswoche spontan als reifes Neugeborenes zur Welt. Die Schwangerschaft und die Geburt verliefen ohne Komplikationen. Bereits während der Schwangerschaft war eine intrauterine Wachstumsretardierung aufgefallen, bei der Geburt lag die Patientin mit einer Körperlänge von 41 cm (-4,84 SD von der Norm), einem Geburtsgewicht von 1690 g (-4,22 SD) und einem Kopfumfang von 31 cm (-2,3 SD) deutlich unterhalb der 4. Perzentile. Sie wies eine symmetrische Wachstumsretardierung auf und erfüllte die Kriterien der SGA-Geburtlichkeit.

Körperlich zeigte die Patientin eine für das TS charakteristische Fazies mit einer hohen vorgewölbten Stirn, einem kleinen Gesichtsschädel, einer Mittelgesichtshypoplasie, einem flachen Nasensattel, einem Telekanthus, einer vollen Unterlippe, einem zeltförmigem Mund und einem flachen Philtrum. Weiterhin fielen ein spärlicher Haarwuchs und eine Uvula bifida auf. Es bestand eine leichte Klinodaktylie, das Nagelwachstum verlief sehr langsam.

Auch die weitere Entwicklung der Patientin verlief global verzögert. Sprachliche, geistige und motorische Entwicklung lagen für das Alter zurück. Mit 12 Monaten konnte Klu280204 krabbeln und sitzen, mit 13 Monaten sprach sie erste Worte, freies Laufen erlernte sie mit 1 $\frac{3}{4}$ Jahren. Ferner bestand eine postnatale Wachstumsverzögerung, mit 5 Jahren lag sie mit ihrer Körperlänge immer noch unterhalb der 3. Perzentile. Der Kleinwuchs ist bis dato persistierend. Das

Knochenalter war im 2. Lebensjahr retardiert, weitere Verlaufsdaten hierzu lagen nicht vor. Im 5. Lebensjahr wurde eine zentrale Pubertas praecox diagnostiziert.

Die Patientin weist somit viele für das Temple-Syndrom typische Merkmale auf (siehe Tab. 12). Der erhobene Befund ist mit dem klinischen Phänotyp vereinbar.

Tabelle 12: klinischer Vergleich Klru280204 mit Phänotyp TS

	Typischer Phänotyp Temple-Syndrom	Klru280204
Fazies	Prominente Stirn Kurzes Philtrum Uvula bifida Hydrocephalus	Prominente Stirn, kurzes Philtrum, Uvula bifida, kleine Zähne Mikrognathie, leicht hypoplastisches Mittelgesicht Telekanthus, flacher Nasensattel, zeltförmiger Mund
Entwicklung	Prä- und postnatale Wachstumsretardierung IQ normal? Motorische Entwicklungsverzögerung Pubertas praecox	Wachstumsretardierung Globale Entwicklungsverzögerung (sprachlich und motorisch) Pubertas praecox
Weitere Dysmorphiezeichen	Kleine Hände und Füße Klinodaktylie V Skoliose Stammbetonte Adipositas Weiter Mamillenabstand Kleines Genitale	Kleine Hände Klinodaktylie V beidseits
Neurologische Auffälligkeiten	Tremor Leichte Hemiplegie Hypotonie	

4.2.4 Andere Ursachen der SGA-Geburtlichkeit

Die pränatale Entwicklung wird durch viele Faktoren beeinflusst. So spielen bei der SGA-Geburtlichkeit neben genetischen und epigenetischen Aberrationen auch maternale und umweltbedingte Faktoren eine Rolle und konnten auch in dieser Studie nicht eliminiert werden. Beispielsweise ist bekannt, dass eine Plazentainsuffizienz mit einem deutlich erhöhten Risiko für eine intrauterine Wachstumsretardierung einhergeht. Campbell et al. konnte nachweisen, dass

mütterliches Alter ≥ 35 Jahre, Nikotinkonsum während der Schwangerschaft, Präeklampsie, Primiparität und mütterliches Untergewicht mit SGA-Geburtlichkeit assoziiert sind (Campbell et al. 2012). In dieser Arbeit könnten bei 56% der Patienten maternale Faktoren zur SGA-Geburtlichkeit beigetragen haben. Bei 38% konnten anamnestisch keine pränatalen Einflussfaktoren detektiert werden, bei drei Patienten lagen keine Angaben vor.

4.3 Fazit/Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine Gruppe von 50 SGA-geborenen Kindern einem Screening nach Methylierungsveränderungen an 11 verschiedenen imprinteten Genorten unterzogen. Um die Aussagekraft dieser Ergebnisse zu stärken wäre eine Erweiterung der Studie sinnvoll, indem eine größere Anzahl von SGA-geborenen Patienten und weitere Genorte, wie z.B. *H19_3CTCF*, untersucht werden.

Es konnten insgesamt vier von 50 SGA-geborenen Kinder mit auffälligen Methylierungsmustern an zwei verschiedenen Genorten identifiziert werden, darunter ein Kind mit einem zuvor nicht diagnostizierten TS sowie drei Kinder mit einer Hypermethylierung der *IGF2R*-Region, die in gleicher Häufigkeit auch in der Kontrollkohorte vorkam. Im Falle der *IGF2R*-Hypermethylierung liegt am ehesten ein epigenetischer Polymorphismus vor. Die Neudiagnose eines TS zeigt jedoch, dass Imprintingdefekte bei SGA-geborenen Kindern eine Rolle spielen und unterstreicht den Nutzen von Methylierungsanalysen bei Patienten die weitere Hinweise für das Vorliegen eines Imprintingsyndroms zeigen.

Diese Arbeit ist Teil eines Projektes zur Erforschung von Imprintingstörungen. In diesem Subprojekt werden u. a. SGA-geborene Kinder auf Imprintingdefekte untersucht. Im weiteren Verlauf soll das Kollektiv von bisher 50 SGA-geborenen Patienten auf eine Gesamtzahl von 100 Patienten erweitert werden. Außerdem wurde u.a. alternativ zu *H19_6CTCF*, dessen Ergebnisse aufgrund der starken Variabilität nur eingeschränkt zu verwenden waren, der *H19_3CTCF*-Genort in die Analysen eingeschlossen, ebenso wie *GRB10*, bei dem eine Assoziation mit dem SRS diskutiert wird (Eggermann et al. 2010). Weiterhin sollen Array-Untersuchungen bei allen SGA-Patienten mit auffälligen Methylierungsmustern sowie anderen Imprintingstörungen durchgeführt werden um charakteristische chromosomale Imbalancen und Genotypen zu erfassen. Die Weiterführung läuft derzeit im Institut für Humangenetik des UKSH Kiel.

5 Zusammenfassung

Etwa 3-5 % aller Neugeborenen erfüllen bei Geburt die Kriterien der SGA-Geburtlichkeit. Ursächlich spielen bei der SGA-Geburtlichkeit eine Vielzahl von Faktoren eine Rolle, u. a. können Störungen des genomischen Imprinting mit Wachstumsstörungen assoziiert sein.

Bei Genen, die der elterlichen Prägung unterliegen, ist ihre Expression abhängig von der paternalen Herkunft. Sie liegen meist in Clustern vor und ihre Sequenzen zeichnen sich durch einen hohen CG-Gehalt aus. An Cytosinbasen innerhalb von CG-Dinukleotiden erfolgt die DNA-Methylierung, dem bisher am besten untersuchten Mechanismus des genomischen Imprinting. Dadurch entstehen Regionen mit paternal und maternal unterschiedlicher Methylierung, sogenannte DMRs, die die Expression der geprägten Gene regulieren.

Um die Rolle von Imprintingstörungen als Ursache von SGA-Geburtlichkeit zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit bei 50 SGA-geborenen Patienten DNA-Methylierungsanalysen an den 11 elterlich geprägten Genorten *DIRAS3*, *PLAGL1*, *IGF2R*, *MEST*, *IGF2*, *H19*, *MEG3*, *SNRPN*, *NDN*, *NESP* und *NESPAS* durchgeführt und die Ergebnisse mit einer Kontrollkohorte verglichen. Dazu wurde zunächst die DNA aus EDTA-Blut extrahiert, anschließend erfolgte eine Bisulfitkonversion. Die mittels PCR amplifizierten Genabschnitte wurden dann pyrosequenziert und auf ihren Methylierungsstatus hin analysiert.

Bei den Genorten *DIRAS3*, *IGF2R* und *MEST* zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen, die aufgrund der Heterogenität der Gruppen höchstwahrscheinlich nicht von biologischer Relevanz sind. In der individuellen Auswertung der Einzelproben zeigte sich bei drei Patienten eine Hypermethylierung des *IGF2R*-Genortes, die in ähnlicher Häufigkeit auch in der Kontrollgruppe auftrat, sodass es sich am ehesten um einen epigenetischen Polymorphismus handelt. Die Patientin Klru280204 wies eine Hypomethylierung des Genortes *MEG3* auf. Das Vorliegen eines Temple-Syndroms wurde mit alternativen Methoden verifiziert und passt zum klinischen Phänotyp der Patientin.

Insgesamt sind Methylierungsveränderungen an elterlich geprägten Genorten bei SGA-geborenen Kindern seltene Ereignisse.

6 Literaturverzeichnis

- Abu-Amero, S., Monk, D., Frost, J., Preece, M., Stanier, P., Moore, G. E. (2008). The genetic aetiology of Silver-Russell syndrome. *J. Med. Genet*, 4: 193–199.
- Ammerpohl, O., Martín-Subero, J. I., Richter, J., Vater, I., Siebert, R. (2009). Hunting for the 5th base: Techniques for analyzing DNA methylation. *Biochim. Biophys. Acta*, 9: 847–862.
- Arima, T., Drewell, R. A., Arney, K. L., Inoue, J., Makita, Y., Hata, A., Oshimura, M., Wake, N., Surani, M. A. (2001). A conserved imprinting control region at the HYMAI/ZAC domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. *Hum. Mol. Genet*, 14: 1475–1483.
- Bell, A. C., Felsenfeld, G. (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature*, 6785: 482–485.
- Beckwith, J. B. (1969). Macroglossia, omphalocele, adrenal cytomegaly, gigantism, and hyperplastic visceromegaly. *Birth Defects*, 5 (2):188.
- Brakensiek, K., Wingen, L. U., Länger, F., Kreipe, H., Lehmann, U. (2007). Quantitative high-resolution CpG island mapping with Pyrosequencing reveals disease-specific methylation patterns of the CDKN2B gene in myelodysplastic syndrome and myeloid leukemia. *Clin. Chem*, 1: 17–23.
- Braulke, T. (1999). Type-2 IGF receptor: a multi-ligand binding protein. *Horm. Metab. Res*, 31: 242–246.
- Buiting, K. (2010). Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet*, 3: 365–376.
- Butler, M. G. (1990). Prader-Willi syndrome: current understanding of cause and diagnosis. *Am. J. Med. Genet.*, 3: 319–332.
- Butler, M. G. (2009). Genomic imprinting disorders in humans: a mini-review. *J. Assist. Reprod. Genet*, 9-10: 477–486.
- Caliebe, A., Freitag, S., Fritzer, E., Neumann, P., Hedderich, J., Krawczak, M. (2008). Methodik des wissenschaftlichen Arbeitens. Vorlesungsskript. Institut für Medizinische Informatik und Statistik, CAU. Kiel.
- Campbell, M. K., Cartier, S., Xie, B., Kouniakakis, G., Huang, W., Han, V. (2012). Determinants of small for gestational age birth at term. *Paediatr. Perinat. Epidemiol*, 6: 525–533.

- Cattanach, B. M., Kirk, M. (1985). Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature*, 6019: 496–498.
- Chatelain, P., Carrascosa, A., Bona, G., Ferrandez-Longas, A., Sippell, W. (2007). Growth hormone therapy for short children born small for gestational age. *Horm. Res*, 6: 300–309.
- Choudhuri, S., Cui, Y., Klaassen, C. D. (2010). Molecular targets of epigenetic regulation and effectors of environmental influences. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 245: 378–393.
- Constância, M., Pickard, B., Kelsey, G., Reik, W. (1998). Imprinting mechanisms. *Genome Res.*, 9: 881–900.
- Coolen, M. W., Statham, A. L., Qu, W., Campbell, M. J., Henders, A. K., Montgomery, G. W., Martin, N. G., Clark, S. J. (2011). Impact of the genome on the epigenome is manifested in DNA methylation patterns of imprinted regions in monozygotic and dizygotic twins. *PLoS ONE*, 10: e25590.
- Cutfield, W. S., Hofman, P. L., Mitchell, M., Morison, I. M. (2007). Could epigenetics play a role in the developmental origins of health and disease? *Pediatr. Res.*, 5 Pt 2: 68R-75R.
- Dahl, C., Guldberg, P. (2003). DNA methylation analysis techniques. *Biogerontol*, 4: 233–250.
- Demars, J., Shmela, M. E., Rossignol, S., Okabe, J., Netchine, I., Azzi, S., Cabrol, S., Le Caignec, C., David, A., Le Bouc, Y., El-Osta, A., Gicquel, C. (2010). Analysis of the IGF2/H19 imprinting control region uncovers new genetic defects, including mutations of OCT-binding sequences, in patients with 11p15 fetal growth disorders. *Hum. Mol. Genet*, 5: 803–814.
- Doctor, B. A., O'Riordan, M. A., Kirchner, H. L., Shah, D., Hack, M., ChB (2001). Perinatal correlates and neonatal outcomes of small for gestational age infants born at term gestation. *Am. J. Obstet. Gynecol*, 3: 652–659.
- Dupont, J.-M., Tost, J., Jammes, H., Gut, I. G. (2004). De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology. *Anal. Biochem*, 1: 119–127.
- Eggermann, T., Begemann, M., Binder, G., Spengler, S. (2010). Silver-Russell syndrome: genetic basis and molecular genetic testing. *Orphanet. J. Rare Dis*, 19.
- Engel, E. (1980). A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. *Am. J. Med. Genet.*, 2: 137–143.

- England, R., Pettersson, M. (2005). Pyro Q-CpG™: quantitative analysis of methylation in multiple CpG sites by Pyrosequencing®. *Nat. Meth*, 10.
- Firth, H. V., Richards, S. M., Bevan, A. P., Clayton, S., Corpas, M., Rajan, D., van Vooren, S., Moreau, Y., Pettett, R. M., Carter, N. P. (2009). DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am. J. Hum. Genet.*, 4: 524–533.
- Geuns, E., Temmerman, N. de, Hilven, P., van Steirteghem, A., Liebaers, I., Rycke, M. de (2007). Methylation analysis of the intergenic differentially methylated region of DLK1-GTL2 in human. *Eur. J. Hum. Genet*, 3: 352–361.
- Goldstone, A. P. (2004). Prader-Willi syndrome: advances in genetics, pathophysiology and treatment. *Trends Endocrinol. Metab.*, 1: 12–20.
- Haake, A. (2009). Konstitutionelle und somatische Veränderungen an imprinteten Genorten. Diplomarbeit. Kiel.
- Horsthemke, B. (2006). Epimutations in human disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*: 45–59.
- Izzi, B., Decallonne, B., Devriendt, K., Bouillon, R., Vanderschueren, D., Levtchenko, E., Zegher, F. de, van den Bruel, A., Lambrechts, D., van Geet, C., Freson, K. (2010). A new approach to imprinting mutation detection in GNAS by Sequenom EpiTYPER system. *Clin. Chim. Acta*, 23-24: 2033–2039.
- Karlberg, J., Albertsson-Wikland, K. (1995). Growth in full-term small-for-gestational-age infants: from birth to final height. *Pediatr. Res.*, 5: 733–739.
- Lee, P. A., Chernausek, S. D., Hokken-Koelega, A. C., Czernichow, P. (2003). International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age, April 24-October 1, 2001. *Pediatr*, 6 Pt 1: 1253–1261.
- Li, E., Beard, C., Jaenisch, R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 6453: 362–365.
- Mackay, D. J., Callaway, J. L., Marks, S. M., White, H. E., Acerini, C. L., Boonen, S. E., Dayanikli, P., Firth, H. V., Goodship, J. A., Haemers, A. P., Hahnemann, J. M., Kordonouri, O., Masoud, A. F., Oestergaard, E., Storr, J., Ellard, S., Hattersley, A. T., Robinson, D. O., Temple, I. K. (2008). Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57. *Nat. Genet*, 8: 949–951.

- Mackay, D. J., Coupe, A.-M., Shield, J. P., Storr, J. N., Temple, I. K., Robinson, D. O. (2002). Relaxation of imprinted expression of ZAC and HYMAI in a patient with transient neonatal diabetes mellitus. *Hum. Genet*, 2: 139–144.
- McGrath, J., Solter, D. (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, 1: 179–183.
- Miozzo, M., Simoni, G. (2002). The role of imprinted genes in fetal growth. *Biol. Neonate*, 4: 217–228.
- Neumann, B., Kubicka, P., Barlow, D. P. (1995). Characteristics of imprinted genes. *Nat. Genet.*, 1: 12–13.
- Niklasson, A., Albertsson-Wikland, K. (2008). Continuous growth reference from 24th week of gestation to 24 months by gender. *BMC Pediatr*, 1: 8.
- Paulsen, M., El-Maarri, O., Engemann, S., Strödicke, M., Franck, O., Davies, K., Reinhardt, R., Reik, W., Walter, J. (2000). Sequence conservation and variability of imprinting in the Beckwith-Wiedemann syndrome gene cluster in human and mouse. *Hum. Mol. Genet.*, 12: 1829–1841.
- Poole, R. L., Baple, E., Crolla, J. A., Temple, I. K., Mackay, D. J. (2010). Investigation of 90 patients referred for molecular cytogenetic analysis using aCGH uncovers previously unsuspected anomalies of imprinting. *Am. J. Med. Genet. A*, 8: 1990–1993.
- Price, S. M., Stanhope, R., Garrett, C., Preece, M. A., Trembath, R. C. (1999). The spectrum of Silver-Russell syndrome: a clinical and molecular genetic study and new diagnostic criteria. *J. Med. Genet.*, 11: 837–842.
- Reik, W., Walter, J. (2001). Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat. Rev. Genet.*, 1: 21–32.
- Runte, M., Kroisel, P. M., Gillessen-Kaesbach, G., Varon, R., Horn, D., Cohen, M. Y., Wagstaff, J., Horsthemke, B., Buiting, K. (2004). SNURF-SNRPN and UBE3A transcript levels in patients with Angelman syndrome. *Hum. Genet*, 6: 553–561.
- Russell, A. (1954). A syndrome of intra-uterine dwarfism recognizable at birth with cranio-facial dysostosis, disproportionately short arms, and other anomalies (5 examples). *Proc. R. Soc. Med.*, 12: 1040–1044.
- Silver, H. K., Kiyasu, W., George, J., Deamer, W. C. (1953). Syndrome of congenital hemihypertrophy, shortness of stature, and elevated urinary gonadotropins. *Pediatr.*, 4: 368–376.

- Smrzka, O. W., Faé, I., Stöger, R., Kurzbauer, R., Fischer, G. F., Henn, T., Weith, A., Barlow, D. P. (1995). Conservation of a maternal-specific methylation signal at the human IGF2R locus. *Hum. Mol. Genet.*, 10: 1945–1952.
- Surani, M. A., Barton, S. C., Norris, M. L. (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*, 5959: 548–550.
- Takai, D., Gonzales, F. A., Tsai, Y. C., Thayer, M. J., Jones, P. A. (2001). Large scale mapping of methylcytosines in CTCF-binding sites in the human H19 promoter and aberrant hypomethylation in human bladder cancer. *Hum. Mol. Genet.*, 23: 2619–2626.
- Temple, I. K. (2007). Imprinting in human disease with special reference to transient neonatal diabetes and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Endocr. Dev.*, 113–123.
- Temple, I. K., Cockwell, A., Hassold, T., Pettay, D., Jacobs, P. (1991). Maternal uniparental disomy for chromosome 14. *J. Med. Genet.*, 8: 511–514.
- Temple, I. K., Shrubbs, V., Lever, M., Bullman, H., Mackay, D. J. (2007). Isolated imprinting mutation of the DLK1/GTL2 locus associated with a clinical presentation of maternal uniparental disomy of chromosome 14. *J. Med. Genet.*, 10: 637–640.
- Tost, J., Gut, I. G. (2007). DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat. Protoc.*, 9: 2265–2275.
- Turner, C. L., Mackay, D. M., Callaway, J. L., Docherty, L. E., Poole, R. L., Bullman, H., Lever, M., Castle, B. M., Kivuva, E. C., Turnpenny, P. D., Mehta, S. G., Mansour, S., Wakeling, E. L., Mathew, V., Madden, J., Davies, J. H., Temple, I. K. (2010). Methylation analysis of 79 patients with growth restriction reveals novel patterns of methylation change at imprinted loci. *Eur. J. Hum. Genet.*, 6: 648–655.
- Tycko, B., Morison, I. M. (2002). Physiological functions of imprinted genes. *J. Cell. Physiol.*, 3: 245–258.
- van Dijk, M., Bannink, E. M., van Pareren, Y. K., Mulder, P. G., Hokken-Koelega, A. C. (2007). Risk factors for diabetes mellitus type 2 and metabolic syndrome are comparable for previously growth hormone-treated young adults born small for gestational age (sga) and untreated short SGA controls. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1: 160–165.

- Weksberg, R., Smith, A. C., Squire, J., Sadowski, P. (2003). Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Hum. Mol. Genet.* R61-8.
- Wiedemann, H. R. (1964). Complexe malformatif familial avec hernie ombilicale et macroglossie – un “syndrome nouveau”? *J. Genet. Hum.* 223–232.
- Williams, C. A., Beaudet, A. L., Clayton-Smith, J., Knoll, J. H., Kyllerman, M., Laan, L. A., Magenis, R. E., Moncla, A., Schinzel, A. A., Summers, J. A., Wagstaff, J. (2006). Angelman syndrome 2005: updated consensus for diagnostic criteria. *Am. J. Med. Genet. A*, 5: 413–418.
- Yu, Y., Fujii, S., Yuan, J., Luo, R. Z., Wang, L., Bao, J., Kadota, M., Oshimura, M., Dent, S. R., Issa, J.-P., Bast, R. C. (2003). Epigenetic regulation of ARHI in breast and ovarian cancer cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 268–277.
- Zegher, F. de, Francois, I., van Helvoirt, M., Beckers, D., Ibáñez, L., Chatelain, P. (1998). Growth hormone treatment of short children born small for gestational age. *Trends. Endocrinol. Metab*, 6: 233–237.
- Zeschnigk, M., Schmitz, B., Dittrich, B., Buiting, K., Horsthemke, B., Doerfler, W. (1997). Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Hum. Mol. Genet.*, 3: 387–395.

7 Anhang

Tabelle 13: Übersicht über die PCR-Bedingungen

Assay-Name	PLAGL 1_b	MEST	IGF2	H19_6 CTCF	NDN_1	SNRPN	MEG3	DIRAS3	NESP	NESPAS	IGF2R
Verwendete DNA-Poly- merase	Ampli- Taq	Pyro Mark	Pyro Mark	Accu Prime	Ampli- Taq	Ampli- Taq	Pyro Mark	Pyro Mark	Pyro Mark	Pyro Mark	Pyro Mark
ddH2O (µl)	17,3	16,5	8	20	17,3	18,3	8	7	8	8	15
Puffer II (Accu Prime) (µl)				2,5							
10xPCR Puffer (Ampli Taq) (µl)	2,5				2,5	2,5					
PyroMark- PCR-Puffer (µl)		25	12,5				12,5	12,5	12,5	12,5	25
Coral-Load (µl)		5	2,5				2,5	2,5	2,5	2,5	5
MgCl2 (µl)	2				2	1		1			1
dNTPs (µl)	1				1	1					
Primer (µl) (20 pmol/µl)	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1
Accu Prime (µl)				0,5			0,5				
Ampli-Taq (µl)	0,2				0,2	0,2					
BIS-DNA (µl)	1	1,5	1	1	1,5	1		1	1	1	2
Annealing Temperatur (°C)	55	60	60	55	60	60	60	55	60	60	55
Amplifikat- länge (bp)	225	554	310	240	304	251	452	293	301	226	266
Menge PCR- Produkt (µl)	20	40	20	20	20	20	20	20	20	20	40

Zusammenfassung der PCR- Bedingungen für die Assays der 11 untersuchten Genorte. Die Tabelle gibt Auskunft über Art und Menge der verwendeten Zusätze, eingesetzte Proben-DNA (BIS- DNA) und Termocyclerbedingungen.

Tabelle 14: Methylierungswerte der Genortes DIRAS3 1q32

SGA	MW	CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6	CpG 7	CpG 8	CpG 9		MW	CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6	CpG 7	CpG 8
Klen190400	42,8	46,8	42,1	41,8	47,0	42,9	38,6	37,1	42,6	46,0	Kontrollen	48,7	52,2	49,1	45,8	54,4	50,6	44,4	45,2	48,1
Klci140795	44,4	50,2	45,9	43,4	47,2	44,4	41,3	38,4	45,4	43,3		56,7	59,3	54,9	53,1	58,4	55,9	53,1	53,3	58,9
Klly111097	45,6	50,9	49,4	43,6	48,7	43,6	44,1	40,8	43,6	45,8		54,7	56,6	54,4	51,2	55,6	55,9	52,4	53,0	55,7
Klmh180596	45,7	50,9	48,3	44,9	46,8	43,2	41,5	40,7	47,8	47,1		59,7	62,1	58,5	54,3	62,7	62,7	55,5	55,5	64,8
Klm250398	43,3	48,5	47,0	42,8	44,0	42,5	38,7	37,7	43,9	44,6		48,1	49,4	49,5	46,5	50,1	49,3	46,4	44,4	48,8
Klku160492	46,2	50,4	48,1	44,1	51,7	44,4	43,1	41,3	46,7	46,0		57,1	59,0	57,6	53,3	59,1	57,5	54,8	53,7	60,2
Kline180499	42,4	49,4	42,4	39,7	44,9	41,3	38,5	37,3	42,6	45,9		52,4	54,0	50,2	46,9	53,7	53,7	52,3	50,0	54,9
Klck260996	53,6	55,6	54,7	53,2	58,4	51,3	51,5	46,9	52,4	58,6		45,3	46,5	45,9	42,6	46,3	46,1	43,5	41,9	47,1
Klmr231091	46,8	49,0	46,5	44,3	45,8	53,8	42,4	42,0	47,6	49,7		52,1	52,1	50,1	50,2	53,1	52,7	52,1	49,2	53,9
Kini190493	41,9	46,2	43,8	39,6	45,8	39,9	38,2	37,8	41,3	44,7		57,5	62,6	57,4	49,6	58,5	58,9	54,2	58,3	59,9
Kinn260496	47,0	52,0	44,5	48,8	49,4	48,2	40,7	40,4	45,6	53,7		46,1	46,3	47,1	42,8	57,1	55,9	44,0	32,2	43,6
Kira011096	42,5	47,8	44,9	40,7	44,6	43,9	39,6	34,6	42,1	44,0		46,9	49,6	46,4	43,0	47,7	48,3	45,4	46,7	47,0
Kine280398	48,4	53,1	47,7	47,4	53,9	46,9	43,2	40,9	48,0	54,7		46,9	49,1	44,8	44,1	49,2	46,7	44,9	44,1	47,1
Kinh081294	46,6	50,6	47,0	44,4	50,9	44,7	40,8	41,0	47,7	52,2		42,7	42,7	43,5	41,7	45,4	44,6	40,8	40,3	42,5
Kire080104	42,4	46,8	42,7	42,7	45,8	42,7	41,4	36,5	41,9	41,2		46,5	48,3	44,7	43,7	47,7	49,1	43,5	44,5	47,7
Kis280700	43,6	47,4	42,3	42,1	46,2	42,5	43,0	38,1	44,9	45,8		44,5	46,2	45,3	42,4	46,8	46,4	41,4	41,4	46,3
Kikh300705	44,9	51,7	45,6	43,1	46,5	43,7	39,8	40,5	46,8	46,5		42,7	44,6	43,3	38,8	44,5	42,5	41,6	41,3	44,5
Klin180900	43,2	46,2	46,2	45,0	44,1	43,5	38,8	38,9	42,9	43,4		47,0	48,4	46,0	43,4	49,1	48,2	46,1	44,2	48,3
Klbo081201	44,7	49,1	44,9	42,6	48,8	45,5	41,2	36,0	44,1	50,6		51,3	48,8	51,6	46,9	53,4	52,0	51,6	51,4	51,5
Kliz1311009	45,2	50,3	42,6	45,8	48,4	45,3	40,4	38,7	45,3	49,5		44,1	45,2	44,6	42,3	46,7	45,6	42,1	40,6	45,8
Kina291009	41,6	47,1	44,2	41,7	46,8	40,3	35,8	35,0	40,1	43,8		51,6	55,9	48,1	49,1	50,8	51,4	49,0	49,3	53,5
Kine090197	44,8	49,9	46,5	42,9	50,6	45,1	40,0	37,3	42,4	48,7		54,4	58,1	54,1	48,6	55,6	59,2	51,5	52,5	56,5
Klan101109	44,2	53,5	42,5	42,1	48,3	46,9	37,7	39,2	42,9	45,1		51,1	56,4	49,2	47,6	49,0	49,8	48,6	47,7	54,4
Klinu201109	39,9	45,1	43,7	38,5	41,8	38,6	33,4	31,2	41,5	44,7		63,3	67,4	74,1	67,8	52,5	68,5	57,5	57,9	61,5
Klye200406	42,0	46,7	47,5	40,3	43,9	40,6	36,3	38,3	41,2	43,1		54,2	60,4	52,4	51,8	59,4	54,2	50,4	49,2	53,8
Klte210310	45,2	48,4	46,3	44,1	46,2	52,0	38,9	38,4	44,8	48,2		55,5	58,5	54,8	51,3	58,3	57,3	53,8	52,1	54,7
Kina120909	43,3	48,1	44,6	43,5	51,4	42,4	38,2	34,9	41,8	44,7		61,9	63,1	64,1	59,3	68,1	63,5	56,8	56,3	62,5
Klns270610	38,1	42,9	40,8	37,2	39,6	36,2	31,6	34,3	41,7	39,0		53,4	56,1	51,5	49,8	55,3	51,2	48,2	51,0	55,1
Klru280204	45,9	50,3	47,9	44,1	50,1	44,5	39,5	41,4	46,4	48,5		53,2	55,4	56,3	49,3	53,5	56,6	50,2	48,8	56,6
Klnl090606	44,6	48,9	45,5	44,7	47,7	44,0	41,1	37,8	43,0	48,8		59,7	63,3	63,6	54,8	63,6	63,5	53,8	54,2	62,9
Kly1x20810	42,3	47,1	44,9	41,1	46,2	42,5	37,7	37,3	40,9	42,8		53,4	53,7	55,0	51,5	57,1	53,1	50,8	51,2	54,0
Klro10509	44,9	48,0	46,6	45,5	49,0	47,4	39,5	38,9	43,4	45,6		56,0	57,7	57,3	53,7	59,5	58,7	52,6	50,7	55,4
Kinh151209	40,2	44,5	42,4	38,8	45,1	40,4	35,6	32,4	41,4	41,6		70,6	72,7	70,0	66,9	73,4	76,5	67,1	62,9	69,8
Klnn211209	42,7	43,1	42,2	41,1	47,2	44,3	39,4	37,1	42,6	47,7		56,6	64,5	54,1	53,5	59,2	55,6	54,9	50,5	57,5
Kltn160703	43,9	48,2	48,7	44,4	47,0	41,2	39,0	38,7	43,7	44,7		56,1	58,1	52,5	49,9	56,6	58,4	55,7	54,5	56,5
Kle100310	44,0	50,4	46,6	45,8	47,7	44,3	35,7	37,9	42,3	45,2		69,6	73,0	71,1	66,9	72,8	72,8	66,5	65,8	70,0
Klnc240410	46,8	49,6	46,8	45,7	52,5	49,2	42,8	38,9	47,6	47,8		51,4	55,7	52,1	49,1	53,6	52,6	47,8	47,8	51,4
Kldm150902	43,1	49,4	43,6	44,6	47,3	42,0	37,2	34,2	43,6	46,6		57,4	62,6	58,3	53,7	58,4	56,5	55,8	54,5	60,2
Klde120499	44,7	51,0	48,3	43,4	45,8	43,8	40,0	39,9	44,8	45,1		55,8	59,9	57,6	51,8	57,6	56,4	53,1	54,2	56,9
Klr210402	41,4	46,7	43,6	39,7	45,1	41,8	37,1	34,3	40,6	43,3		57,8	58,0	58,9	53,2	62,8	56,1	53,7	55,2	61,8
Klrb040497	44,9	46,7	48,1	44,3	46,8	42,8	39,8	41,4	46,3	47,9	43,2	48,9	43,2	45,1	42,6	44,3	38,3	42,1	42,3	
Klmd040898	41,0	45,7	40,8	39,4	46,0	40,8	37,1	36,1	41,1	42,5	40,2	40,6	41,6	41,7	40,7	36,7	38,7	38,1	38,9	
Klod300802	43,4	47,7	44,6	42,9	47,3	40,2	40,2	38,7	41,9	47,3	45,4	50,6	45,8	49,3	44,5	46,1	40,3	41,5	42,9	
Kline100999	40,2	45,3	44,0	39,0	42,3	39,5	34,9	35,0	39,5	42,2	45,4	50,0	45,6	47,7	46,4	45,0	43,3	40,1	43,1	
Klee120498	43,5	47,3	42,9	42,0	43,5	47,6	38,6	36,6	46,0	46,8	58,7	62,3	56,2	56,0	61,1	58,0	54,6	52,1	62,4	
Klhb110597	46,4	53,1	48,0	47,7	53,9	49,4	46,5	17,6	50,1	51,2	50,2	58,2	51,5	54,8	46,6	47,4	48,7	45,8	46,3	
Klmo120102	43,3	49,0	45,8	40,8	47,2	40,2	38,7	39,1	45,0	43,8	41,5	43,9	39,8	44,8	41,9	37,0	38,7	37,6	43,4	
Klca020702	47,1	49,8	48,6	44,2	50,4	53,8	40,7	39,4	47,5	49,7	63,5	72,1	66,0	65,2	62,2	63,0	56,5	61,2	60,1	
Kina010999	43,6	47,5	42,7	43,6	46,9	43,6	40,3	36,3	41,8	49,5	48,7	52,1	44,6	47,1	48,6	46,6	47,7	48,0	51,2	
Kler040398	47,2	51,2	46,7	47,1	52,6	48,9	45,0	41,0	39,4	53,2	43,1	46,7	43,5	43,5	41,2	43,1	39,7	40,8	45,7	

Methylierungsergebnisse der SGA- und der Kontrollgruppe des Genortes DIRAS. Die erste Spalte eines Genortes zeigt den Mittelwert einer Probe (MW), jede weitere Spalte steht für einen einzelnen CpG, jede Zeile stellt eine analysierte Probe dar. Methylierungswerte in % Methylierung.

Tabelle 15: Methylierungswerte der Genortes *IGF2R* 6q25

SGA	MW	CpG 22	CpG 21	CpG 20	CpG 19	CpG 18	CpG 17		MW	CpG 22	CpG 21	CpG 20	CpG 19	CpG 18	CpG 17
Klen190400	48,3	43,5	48,7	55,0	55,2	39,4	47,8		52,0	46,8	55,2	58,2	59,9	45,0	46,8
Klci140795	81,6	96,6	89,5	82,4	92,5	51,1	77,7		52,1	50,6	60,4	51,5	61,6	40,1	48,3
Klly111097	45,1	44,5	49,1	49,3	48,4	36,5	42,7		53,3	56,4	54,6	55,1	61,1	41,9	50,9
Klmh180596	46,9	43,4	46,8	51,6	58,7	37,5	43,4		51,6	52,0	50,1	52,3	61,2	46,2	47,9
Klvi250398	38,9	41,8	45,3	50,5	49,3	35,8	10,8		53,9	54,3	55,3	56,9	63,8	42,6	50,2
Klku160492	46,0	43,9	46,5	52,5	55,5	36,2	41,4		51,3	50,6	53,8	54,9	59,2	43,4	46,0
Klne180499	82,2	96,5	87,7	82,3	93,9	53,1	79,6		58,5	61,7	62,7	62,6	66,1	43,3	54,3
Klck260996	57,1	55,7	60,3	60,8	66,6	43,4	55,8		52,8	54,0	54,8	56,7	61,4	40,6	49,4
Klmr231091	44,7	44,5	44,7	47,7	52,9	36,9	41,5		47,5	44,3	49,0	52,0	55,5	39,0	45,0
Kinl190493	45,4	42,7	47,2	52,7	53,5	35,3	40,8		49,5	47,1	49,4	52,5	53,8	42,1	52,3
Klkn260496	52,5	47,3	52,4	56,8	61,7	46,2	50,4		48,0	43,7	49,5	50,8	58,3	41,9	44,2
Klra011096	47,5	46,4	49,7	52,5	55,8	37,5	43,1		41,3	38,5	41,1	38,9	47,0		
Klne280398	48,1	43,3	50,2	55,8	52,4	39,4	47,3		51,4	50,1	55,4	52,1	55,4	45,1	50,3
Klnh081294	44,4	41,5	44,7	46,8	51,8	38,7	43,0		54,7	50,5	54,4	59,7	64,5	47,0	52,4
Klre080104	53,9	51,4	58,4	60,2	61,4	42,3	50,1		47,8	44,0	48,0	50,1	58,1	39,8	46,7
Klvs280700	83,7	96,5	89,1	84,1	94,1	55,4	83,0		45,7	45,0	47,1	46,7	55,7	38,3	41,6
Klkh300705	42,9	45,7	45,2	46,1	48,3	33,3	39,0		48,3	45,2	51,4	49,2	59,0	40,4	44,4
Klin180900	47,1	41,2	49,5	47,6	60,1	40,6	43,7		81,8	96,0	88,7	80,1	92,0	54,6	79,7
Klbo081201	46,3	41,8	45,8	53,6	53,1	40,0	43,6		49,3	63,8	47,6	48,4	53,9	39,4	42,9
Klzl311009	42,8	39,2	42,2	52,5	47,8	35,2	39,8		47,5	41,5	48,9	51,1	56,9	42,4	44,3
Klra291009	48,0	45,1	36,8	60,6	55,5	41,9	48,2		72,6	83,0	79,0	71,2	82,2	52,1	68,1
Klne090197	46,2	42,6	49,1	52,0	55,2	34,8	43,6		48,6	44,8	50,7	53,7	57,7	41,2	43,3
Klan101109	41,9	43,4	41,7	46,4	47,1	33,6	39,4		50,5	49,0	53,9	53,6	58,1	42,0	46,5
Klnu201109	42,3	47,4	46,0	45,0	43,3	32,7	39,3		51,1	48,8	56,0	55,0	56,1	44,5	46,4
Klye200406	44,0	46,2	45,7	45,2	53,3	34,2	39,8		50,3	44,7	53,4	58,6	57,9	40,6	46,5
Klte210310	49,6	46,3	53,6	55,2	56,5	39,8	46,1		73,2	84,2	83,2	74,2	86,0	54,1	57,4
Klra120909	42,4	36,7	44,4	51,9	46,3	34,3	41,1		54,0	46,8	57,4	58,8	64,2	46,1	50,5
Klns270610	43,7	43,0	44,2	51,1	47,7	38,2	38,2		73,9	83,0	83,5	70,1	85,3	53,2	68,2
Klru280204	46,0	45,2	49,1	51,0	52,3	35,8	42,5		47,6	45,2	49,7	51,4	53,1	41,8	44,5
Klnl090606	50,2	47,8	51,7	55,7	58,0	40,2	47,9								
Kly1x20810	45,4	43,8	48,4	52,7	50,6	37,7	39,2		49,2	49,6	49,3	51,4	56,5	44,0	44,5
Klrr010509	47,2	47,2	49,1	50,3	54,9	38,1	43,9		43,2	40,2	43,7	45,7	53,5	35,2	40,7
Klnh151209	46,1	45,2	50,1	49,6	51,1	39,0	41,9		59,0	59,8	60,9	61,4	68,3	44,4	59,4
Klkn211209	45,1	40,5	43,8	52,4	50,2	38,5	45,2		43,7	43,0	42,1	42,8	53,8	38,8	42,1
Kltn160703	49,2	46,2	53,6	52,9	60,3	40,0	42,0		80,8	95,9	86,3	76,5	92,8	54,8	78,6
Klve100310	41,2	43,6	43,3	43,2	46,2	33,4	37,4		51,2	52,5	54,6	56,4	58,0	39,7	46,3
Klnc240410	45,5	45,1	47,5	50,5	49,1	36,5	44,3		52,0	51,0	52,3	54,7	58,8	45,7	49,5
Kldm150902	44,7	45,5	43,3	46,9	51,9	37,9	42,8		55,1	53,2	58,9	59,2	64,9	42,5	52,1
Klde120499	42,9	41,4	44,9	48,4	50,3	33,2	39,4		48,9	47,4	51,8	51,0	56,1	40,7	46,5
Klrl210402	45,2	41,4	47,1	52,2	53,9	34,2	42,3		47,8	48,5	48,8	48,4	57,0	39,4	44,9
Klrb040497	47,6	45,6	50,9	49,7	58,3	38,1	43,2		49,6	47,7	51,3	58,5	53,9	38,8	47,4
Klmd040898	47,4	45,0	49,1	52,8	54,5	37,9	44,9		48,3	38,9	49,4	59,3	55,4	41,3	45,7
Klod300802	43,7	41,6	46,2	48,7	49,0	35,6	41,3		49,7	43,8	51,7	57,5	58,1	40,1	47,0
Klne100999	47,0	42,8	50,3	55,1	52,6	36,6	44,5		44,6	38,4	44,7	49,2	58,5	34,1	42,8
Klee120498	46,6	44,4	47,1	52,6	55,7	36,5	43,4		47,1	43,3	47,1	51,2	57,2	35,7	48,1
Klhb110597	42,4	40,9	43,9	48,2	49,2	33,6	38,7		45,4	32,5	45,7	56,3	55,3	37,3	45,2
Klmo120102	47,0	42,9	48,3	53,0	53,7	40,2	44,0		47,0	40,0	51,0	54,7	50,1	43,0	43,6
Klca020702	42,4	39,1	43,6	46,4	47,1	37,6	40,7		46,3	41,3	42,8	50,2	49,8	44,9	48,9
Klra010999	44,4	38,7	45,5	52,2	56,0	36,7	37,3		50,5	44,0	49,6	55,8	61,8	42,6	49,2
Kler040398	51,4	45,2	53,7	57,3	62,9	40,4	48,8		51,2	45,8	51,7	55,1	61,7	43,6	49,1

Kontrollen

Methylierungsergebnisse der SGA- und der Kontrollgruppe des Genortes *IGF2R*. Die erste Spalte eines Genortes zeigt den Mittelwert einer Probe (MW), jede weitere Spalte steht für einen einzelnen CpG, jede Zeile stellt eine analysierte Probe dar. Methylierungswerte in % Methylierung.

Tabelle 16: Methylierungswerte des Genortes *PLAGL1* 6q24

SGA	MW	CpG 7	CpG 8	CpG 9	CpG 10	CpG 11	CpG 12	CpG 13		MW	CpG 7	CpG 8	CpG 9	CpG 10	CpG 11	CpG 12	CpG 13
Klen190400	27,7	28,6	29,5	28,5	28,6	28,2	24,2	26,2	Kontrollen	28,9	30,8	29,0	31,0	27,7	31,1	25,5	27,4
Klci140795	35,2	37,3	36,5	35,9	37,1	40,1	31,8	27,8		30,6	29,7	30,4	34,8	32,4	32,8	27,3	27,2
Klly111097	33,2	36,2	32,8	34,6	34,7	39,5	28,3	26,6		35,1	36,3	34,5	38,3	34,4	38,9	30,4	32,6
Klmh180596	36,7	38,2	37,5	37,1	37,0	43,5	31,7	32,0		32,1	33,4	32,7	34,5	31,2	33,7	30,0	29,4
Klv250398	34,6	34,4	35,1	36,1	35,8	39,3	30,7	31,0		32,4	36,3	31,9	34,5	31,6	35,9	27,7	28,8
Klku160492	25,6	28,0	23,6	26,6	25,0	27,0	21,3	27,9		34,5	35,6	35,6	37,0	34,7	36,8	31,8	29,9
Klne180499	35,5	39,3	34,3	35,8	35,4	40,4	34,7	28,5		32,5	35,1	32,1	35,0	32,2	36,0	27,0	30,0
Klck260996	38,3	41,6	36,8	40,6	38,9	42,9	33,7	33,2		33,2	33,6	33,4	37,0	33,1	34,8	31,2	29,3
Klmr231091	29,1	31,7	27,5	30,2	30,6	28,2	27,9	27,7		34,3	34,8	33,6	38,8	33,9	36,4	31,8	31,0
Kinl190493	28,2	29,1	31,3	30,1	28,0	26,7	24,9	27,1		33,2	32,8	32,8	34,7	35,2	35,8	27,8	33,4
KlInn260496	33,1	35,3	32,2	35,2	36,4	36,0	30,7	26,2		32,0	35,6	31,5	35,4	30,3	34,6	28,7	28,2
Klra011096	30,5	32,3	29,6	32,2	31,2	36,8	26,9	24,7		32,0	33,9	30,9	35,1	31,4	36,1	28,0	28,7
Klne280398	33,3	35,9	33,1	33,4	33,7	37,3	31,5	28,6		33,5	34,4	33,4	36,7	32,8	36,0	31,9	28,9
Klnh081294	33,7	36,1	31,1	35,8	34,5	38,9	28,6	30,9		33,7	34,5	33,2	37,5	33,6	37,1	29,0	30,7
Klre080104	33,8	37,3	32,6	35,1	34,3	38,5	30,9	28,1		35,8	36,6	35,7	39,0	35,7	37,9	33,5	32,5
Klvs280700	35,4	39,0	33,7	37,6	37,8	39,6	32,6	27,6		33,9	35,2	34,2	36,9	33,3	35,9	31,8	30,4
Klkh300705	34,2	37,8	34,8	35,5	34,6	38,8	30,7	27,3		32,9	35,8	31,9	35,9	32,1	37,1	27,7	29,8
Klin180900	34,6	33,2	35,3	37,2	36,2	39,0	31,6	29,4		29,8	30,7	30,9	32,2	28,4	31,3	26,8	28,6
Klbo081201	36,8	40,4	35,7	39,9	38,8	42,7	32,3	28,2		35,3	37,4	34,5	37,5	34,6	41,5	31,0	30,7
Klzl311009	32,3	34,9	31,6	33,4	33,0	31,8	31,7	29,7		34,8	35,2	35,0	37,5	33,8	37,6	32,2	32,2
KlNa291009	30,0	31,9	30,4	33,6	30,4	28,1	28,2	27,3		27,6	30,1	30,7	33,6	30,7	11,0	27,8	29,6
Klne090197	28,3	28,8	29,1	31,3	28,9	25,6	25,5	28,9		36,9	39,3	39,4	33,6	38,6	41,9	35,9	29,7
Klan101109	28,9	29,2	28,2	29,2	30,2	35,6	26,0	24,0		33,9	33,5	30,6	35,3	36,3	36,4	36,1	28,8
KlNu201109	31,3	32,2	30,8	32,7	32,7	38,8	25,6	26,8		27,7	31,4	29,0	31,4	26,5	29,4	24,1	22,1
Klye200406	30,9	31,0	32,0	31,1	33,6	36,1	25,1	27,5		35,1	35,9	35,1	37,5	35,8	37,7	32,0	31,5
KlTe210310	32,9	34,5	32,7	33,8	34,2	37,6	30,9	26,6		25,5	27,7	24,7	25,2	24,4	29,8	22,9	24,0
KlNa120909	33,6	36,5	33,2	34,3	34,4	37,5	29,3	30,0		37,4	35,1	32,0	48,3	36,8	40,5	33,5	35,4
Klnß270610	30,9	31,8	31,5	31,2	30,8	35,2	27,5	28,6		37,7	40,3	37,3	35,3	41,7	45,6	33,0	30,5
Klru280204	35,5	38,2	36,1	36,0	36,6	39,7	32,2	29,3		39,0	43,1	38,7	37,5	42,7	44,5	35,4	30,9
KlnI090606	34,7	38,0	32,8	38,1	34,5	38,0	31,6	29,7		30,0	29,1	29,0	30,2	30,3	30,8	31,7	28,8
Kly1x20810	32,5	34,1	32,4	32,7	32,3	37,0	29,2	29,7		32,5	36,2	32,4	34,2	32,6	36,5	27,7	28,1
Klrr010509	34,4	35,8	33,7	35,6	34,8	39,0	30,9	31,2		33,7	34,7	34,1	35,5	33,3	37,3	30,9	30,3
Klnh151209	31,9	33,3	30,3	33,6	32,8	36,2	28,9	28,5		34,4	36,0	34,4	37,2	33,1	38,1	29,3	33,0
KlInn211209	33,4	36,6	33,3	36,3	32,9	39,2	31,3	23,9		32,1	33,0	32,6	34,9	31,3	35,2	29,6	28,0
Kltn160703	32,7	34,5	33,3	32,7	33,8	37,5	28,2	29,2		32,8	33,2	33,8	36,5	32,0	34,3	31,4	28,7
Klve100310	32,0	33,0	32,0	36,1	33,3	29,6	29,8	30,2		35,8	36,6	35,7	39,6	36,3	39,2	31,5	32,0
Klnc240410	28,1	28,7	29,1	31,4	28,6	28,0	24,7	26,0		36,2	36,2	36,4	38,0	35,4	39,3	34,8	33,4
Kldm150902	27,5	27,5	27,8	30,3	27,5	26,9	24,2	28,4		34,9	35,4	35,2	36,6	34,7	40,2	30,1	31,7
Klde120499	32,8	33,8	32,8	33,8	34,5	38,1	28,2	28,5		35,5	35,7	35,6	37,4	36,6	39,1	31,7	32,4
Klrl210402	34,4	35,7	33,3	34,8	36,5	38,8	30,3	31,3		35,1	38,6	34,8	39,4	36,7	41,3	28,8	26,0
Klrb040497	35,3	35,8	35,3	37,5	36,8	39,5	32,0	30,4	28,5	31,3	27,2	28,7	28,3	32,7	25,3	25,7	
Klmd040898	36,2	38,9	36,2	36,5	37,3	40,9	34,2	29,5	30,9	31,6	32,0	31,6	30,1	32,2	26,6	32,3	
Klod300802	25,4	26,1	26,7	27,4	25,7	24,3	22,8	25,1	25,9	29,1	27,4	26,7	24,9	27,2	22,1	23,7	
Klne100999	34,5	34,3	35,1	34,7	36,4	39,2	30,1	31,8	31,1	33,3	29,9	33,9	30,8	35,1	28,2	26,7	
Klee120498	35,8	35,0	36,3	38,4	36,7	38,8	35,1	30,2	24,6	26,4	26,3	21,8	26,3	24,9	24,7	21,9	
Klhb110597	31,5	33,5	29,5	33,5	33,1	30,3	28,9		25,3	30,0	21,9	27,6	23,5	28,8	18,0	27,3	
Klmo120102	24,6	27,7	25,4	26,1	22,2	25,5	20,6	24,7	30,1	32,3	30,0	32,5	30,5	31,5	27,2	26,9	
Klca020702	31,3	32,6	31,3	33,3	31,7	38,5	26,4	25,4	28,2	29,1	27,9	28,9	27,5	30,5	26,7	27,0	
KlNa010999	32,4	32,7	32,7	35,9	32,3	32,0	30,4	31,1	30,8	31,6	30,1	32,4	30,3	32,8	29,1	29,2	
Kler040398	36,0	39,4	34,0	39,0	36,9	40,6	35,5	26,9	31,7	33,7	32,3	34,0	31,2	34,3	25,8	30,4	

Methylierungsergebnisse der SGA- und der Kontrollgruppe des Genortes PLAGL1. Die erste Spalte eines Genortes zeigt den Mittelwert einer Probe (MW), jede weitere Spalte steht für einen einzelnen CpG, jede Zeile stellt eine analysierte Probe dar. Methylierungswerte in % Methylierung.

Tabelle 17: Methylierungswerte des Genortes *MEST7q32*

SGA	MW	Cpg 13	Cpg 12	Cpg 11	Cpg 10	Cpg 9	Cpg 8	Cpg 7	Cpg 6	Cpg 5	Cpg 4	Cpg 3	Cpg 2	Cpg 1	Kontrollen	MW	Cpg 13	Cpg 12	Cpg 11	Cpg 10	Cpg 9	Cpg 8	Cpg 7	Cpg 6	Cpg 5	Cpg 4	Cpg 3	Cpg 2
Klen190400	34,5	36,4	31,4	32,3	32,8	29,5	31,8	34,8	37,0	37,5	37,4	44,6	23,7	38,8	28,7	31,2	27,0	29,2	25,7	26,5	27,3	26,8	28,5	33,2	30,9	35,4	23,2	
Klic140795	32,3	35,9	34,9	30,3	34,7	36,9	31,4	25,6	26,2	33,6	28,9	38,9	29,7	33,6	28,3	30,2	26,4	27,4	26,4	26,1	28,2	26,5	27,7	31,6	28,9	32,8	27,1	
Klly111097	36,1	39,0	36,1	31,8	32,3	32,5	34,6	37,6	38,9	37,3	39,3	43,7	27,0	38,9	27,6	27,2	26,8	25,8	28,3	27,6	26,3	26,4	24,4	32,8	30,7	32,4	22,7	
Klmh180596	30,6	35,9	31,1	27,3	28,4	6,1	29,6	33,9	35,7	35,1	35,6	42,6	23,3	33,3	27,9	30,6	28,0	27,6	26,4	26,5	25,6	26,3	27,2	32,5	29,0	31,4	24,1	
Klnz250398	30,3	28,9	29,9	27,1	29,4	28,5	29,2	29,4	30,0	35,0	30,5	35,7	24,6	36,4	26,5	28,0	25,5	26,0	26,7	24,4	23,9	26,2	26,0	29,1	27,5	31,8	22,4	
Klku160492	36,8	37,0	35,5	33,1	34,2	33,8	34,5	37,7	33,2	39,3	37,7	44,7	39,8	37,4	29,4	31,9	29,8	29,4	27,6	28,2	27,5	28,2	27,1	32,8	30,5	33,6	25,9	
Klne180499	36,6	37,5	37,2	35,6	35,4	34,2	33,8	36,1	33,3	39,3	36,4	40,5	34,8	41,3	24,7	24,8	24,0	24,8	24,0	23,7	22,7	23,1	23,5	28,3	26,5	30,3	21,3	
Klck260996	34,4	38,2	35,0	33,5	32,6	29,7	31,4	34,0	31,4	37,2	36,3	40,9	29,2	37,5	33,6	37,3	33,7	33,5	32,0	32,0	32,4	31,5	30,6	36,7	35,0	38,0	30,8	
Klmz231091	30,0	32,7	30,5	27,0	29,5	26,7	28,8	30,2	30,4	29,0	33,7	36,8	24,8	30,0	25,8	29,8	26,9	26,6	25,5	3,5	23,3	27,6	27,7	31,1	30,2	33,5	24,6	
Klnh190493	32,6	35,4	32,4	29,6	28,7	27,8	30,7	33,8	32,9	33,2	37,0	42,3	26,7	33,4	32,4	33,1	31,2	31,7	30,9	30,0	32,3	29,5	32,6	37,2	34,5	36,6	28,6	
Klnz260496	27,6	29,9	26,6	24,2	29,1	28,3	27,5	23,2	22,3	31,1	26,4	36,6	22,2	32,4	25,0	25,8	24,2	26,3	23,6	23,2	23,6	24,6	23,7	27,2	25,6	29,7	22,9	
Klna011096	33,3	37,1	34,3	34,6	31,2	30,3	30,6	31,2	28,2	39,5	35,5	37,0	27,7	36,1	25,6	26,6	24,9	25,5	23,4	23,5	22,9	24,4	25,2	30,2	28,3	29,8	22,6	
Klne280398	34,8	36,8	35,7	34,5	31,6	30,8	33,3	35,1	30,2	37,8	35,8	41,2	30,2	39,8	26,0	26,4	25,8	26,1	23,8	24,8	23,0	26,3	25,8	28,1	27,1	31,5	22,9	
Klnh081294	32,5	34,7	32,6	30,1	29,7	29,6	30,5	32,1	32,9	33,0	35,3	39,5	28,0	35,1	29,5	30,5	27,9	30,2	29,0	27,5	26,4	27,2	27,4	33,9	33,7	35,3	24,7	
Kle080104	31,5	35,0	30,7	27,5	29,2	26,8	29,8	34,4	34,9	31,3	33,3	40,7	23,1	32,7	26,0	28,5	25,8	25,6	25,7	24,8	23,3	24,9	24,6	28,6	27,0	30,4	22,4	
Klz280700	29,8	33,5	29,3	25,3	26,1	25,0	30,6	31,2	31,0	28,2	32,1	39,6	22,6	32,3	26,7	30,0	27,5	28,3	26,0	25,6	24,8	26,7	27,8	30,9	17,7	31,6	24,0	
Klkh300705	31,8	34,6	30,1	30,9	28,4	27,5	30,4	34,5	32,3	33,2	33,5	37,8	26,4	34,2	25,2	26,1	23,9	24,1	24,5	24,0	23,6	25,0	23,8	29,4	26,9	29,5	21,0	
Kln180900	38,7	38,3	36,8	34,3	35,6	36,1	35,4	40,2	34,3	41,9	40,0	48,0	40,7	41,4	26,8	29,6	26,7	27,5	25,6	24,5	23,9	25,7	25,3	31,1	28,7	30,9	22,6	
Klfb081201	36,3	41,3	39,4	36,9	37,6	34,2	35,1	32,9	30,2	41,4	33,6	36,2	34,4	38,8	28,1	28,4	26,7	26,9	26,4	26,3	25,8	27,0	25,2	36,5	30,9	33,5	24,2	
Klz311009	36,0	40,6	38,1	36,1	34,6	33,8	34,4	33,4	34,0	36,2	37,0	39,3	34,5	36,6	26,4	27,7	25,9	25,0	24,7	24,7	24,7	25,5	24,9	31,2	28,4	30,6	23,8	
Klna291009	33,3	35,9	31,9	29,4	31,5	31,2	30,6	32,7	33,1	37,7	33,7	40,8	25,9	38,5	37,8	40,4	37,5	36,8	35,7	34,0	35,1	38,4	39,9	41,9	40,6	45,4	27,7	
Kln090197	35,1	39,5	34,3	32,1	31,8	30,6	34,5	37,3	33,4	37,6	36,3	41,9	28,7	38,6	42,2	43,1	41,7	41,2	39,5	39,8	39,7	43,1	43,3	48,8	43,7	50,3	31,8	
Klna01109	32,3	36,4	32,5	28,6	31,8	31,2	32,7	33,6	41,3	32,5	34,9	44,7	23,9	15,3	35,1	37,2	32,9	33,9	33,5	31,5	33,0	37,1	35,5	39,0	37,1	43,4	26,7	
Klnu201109	36,0	37,6	36,3	34,0	32,8	32,5	35,4	33,8	36,2	39,9	35,5	43,6	33,6	37,0	35,6	36,4	34,5	35,0	33,1	31,8	32,2	37,8	35,6	40,1	39,6	43,9	27,6	
Klye200406	36,0	34,7	32,9	31,0	34,1	33,6	34,1	36,1	34,9	43,9	38,0	41,1	36,4	37,2	36,8	38,0	35,5	37,4	35,3	33,1	34,3	38,8	36,6	40,4	39,6	43,6	28,4	
Klze210310	32,2	32,0	30,8	29,3	30,7	29,4	30,0	34,7	28,8	34,9	34,4	42,0	22,8	38,4	38,1	39,4	37,7	38,1	35,9	35,8	34,5	41,4	36,5	42,9	40,1	46,4	28,1	
Klna120909	31,7	35,6	35,1	31,4	31,2	33,7	30,4	28,2	24,8	36,3	33,7	33,3	28,3	30,2	42,2	44,4	41,3	43,7	42,0	38,3	39,0	44,3	39,7	46,9	44,0	47,8	34,5	
Klnh3270610	36,9	41,5	34,6	33,9	33,3	33,4	35,0	36,3	34,3	40,3	41,9	43,3	33,4	39,2	37,7	38,7	37,6	38,8	37,2	36,7	34,0	36,9	35,5	41,1	38,9	46,4	31,1	
Klnz280204	30,5	30,4	32,4	31,0	28,8	29,9	29,9	26,8	28,3	30,3	31,0	36,7	30,9	30,1	43,6	43,6	44,0	43,6	44,3	42,3	40,8	43,7	40,9	48,9	47,2	48,7	35,5	
Klnl090606	34,8	39,0	33,8	30,8	31,3	31,5	33,4	36,5	35,8	34,8	38,5	44,8	25,3	36,6	38,0	40,6	37,9	36,7	38,3	32,9	35,4	38,7	37,5	42,1	39,9	46,9	28,9	
Kly120810	32,2	34,2	31,6	27,7	29,2	28,7	30,5	31,6	32,4	34,3	35,4	39,3	26,5	37,3	30,1	32,0	28,6	29,7	29,9	28,9	28,1	27,4	28,2	33,9	32,6	37,2	24,8	
Kln010509	34,2	34,3	32,0	27,7	28,3	30,5	31,4	35,0	35,6	39,0	41,4	45,6	28,9	35,0	28,0	29,0	27,6	28,7	26,3	25,3	25,9	29,3	28,2	29,6	28,3	32,8	24,8	
Klnh151209	34,9	35,9	36,3	33,0	34,3	34,1	31,1	30,2	32,2	36,2	29,8	45,9	36,1	38,9	26,4	26,6	25,5	26,6	25,1	25,1	25,1	26,4	24,8	30,0	28,0	32,1	21,6	
Klnz211209	32,5	35,9	31,7	28,8	30,6	31,2	32,1	33,5	29,2	36,6	33,6	38,3	26,5	35,2	29,0	31,5	27,5	28,1	28,6	27,5	27,3	27,3	27,3	32,1	30,4	33,2	27,5	
Kln160703	32,1	36,0	32,4	29,4	31,8	30,1	32,0	35,2	34,0	36,2	35,7	35,3	15,0	34,5	28,3	29,9	27,9	29,0	25,9	26,3	26,2	27,1	27,6	32,4	29,7	32,8	25,2	
Klna100310	34,7	34,4	36,8	32,5	35,2	34,8	35,3	29,6	30,4	41,3	32,4	40,0	30,1	37,7	26,2	26,5	25,0	26,3	25,4	24,3	24,3	23,7	25,8	32,8	26,7	31,5	22,4	
Klnz240410	30,0	32,2	32,7	28,1	30,5	30,9	31,0	27,5	24,3	30,5	29,6	33,7	24,9	33,7	27,3	29,9	27,6	27,2	26,0	24,7	24,4	25,5	25,5	31,1	29,4	33,2	23,5	
Kldm150902	34,7	33,8	33,8	32,7	33,8	31,7	34,9	33,4	31,8	41,2	37,7	39,9	27,4	39,4	25,0	23,6	24,8	24,6	24,4	24,2	22,6	24,1	24,7	28,7	27,1	30,7	20,8	
Klde120499	36,0	37,2	32,2	30,6	31,4	29,9	32,8	33,8	70,5	36,0	36,3	43,4	26,4	28,2	31,5	29,9	29,6	28,2	27,8	26,0	27,3	35,1	38,0	34,4	35,9	45,6	20,7	
Kln210402	34,7	36,6	35,0	32,4	31,3	32,5	32,9	32,4	34,7	43,3	38,6	39,4	29,5	33,0	30,4	31,7	29,7	30,4	30,7	27,2	28,3	29,5	27,1	35,3	32,4	36,3	26,3	
Klrb040497	32,2	32,0	29,9	29,0	30,2	31,5	28,2	31,5	30,7	33,9	35,0	39,9	32,1	34,2	27,9	27,7	27,0	24,5	25,2	23,6	25,5	28,0	28,4	33,4	32,2	36,1	23,9	
Klmd040898	32,1	34,6	32,3	31,2	30,0	27,9	31,6	30,4	30,4	32,0	36,4	38,0	28,5	34,6	29,2	29,3	28,4	26,6	26,1	24,6	27,3	28,7	30,1	31,0	32,0	38,2	28,8	
Klod300802	35,0	38,8	35,2	34,3	32,4	29,3	32,3	34,1	32,8	37,5	37,8	40,5	31,7	38,1	23,5	24,3	24,8	18,8	24,1	21,3	22,5	22,5	23,2	27,0	23,7	27,8	22,4	
Klne100999	33,0	33,8	31,5	29,4	29,6	29,0	30,5	33,0	32,3	36,1	40,1	40,1	27,7	35,6	26,2	26,3	26,6	23,5	24,2	26,1	26,1	25,8	24,3	27,2	27,8	31,9	25,2	
Klee120498	35,9	33,6	34,6	32,0	34,2	33,9	35,2	35,2	67,5	39,4	37,9	17,0	27,0	38,9	30,6	28,6	29,5	28,0	29,1	27,4	30,0	30,9	28,4	35,8	31,5	36,4	31,0	
Klnh110597	34,1	36,5	32,5	29,1	30,0	30,3	34,6	33,1	30,9	35,7	37,9	43,9	36,0	33,5	32,0	32,6	29,8	30,2	31,2	29,4	28,8	30,8	30,8	34,8	31,2</			

Tabelle 18: Methylierungswerte des Genortes H19_6CTCF 11p15

SGA	MW	CpG 9	CpG 10	CpG 11	CpG 12	CpG 13	CpG 14	CpG 15	CpG 16	CpG 17		MW	CpG 9	CpG 10	CpG 11	CpG 12	CpG 13	CpG 14	CpG 15	CpG 16	CpG 17
Klen190400	#####	13,7	11,8	13,6	13,9	10,0	14,1	10,7	12,2	7,2		10,5	10,2	13,8	10,6	11,2	10,2	12,4	7,7	10,2	7,9
Klcl140795	17,9	17,4	19,3	20,0	19,7	17,3	21,0	15,0	17,7	13,9		37,3	37,4	40,4	38,9	39,6	37,3	41,1	31,8	36,1	33,4
Klly111097	22,2	22,2	24,1	24,1	24,0	24,2	24,0	18,8	19,9	18,3		39,8	39,7	42,8	43,2	42,2	40,1	41,4	34,6	36,3	37,6
Klmh180596	29,8	25,1	30,6	31,7	32,3	31,9	34,4	24,7	28,4	29,3		38,5	39,7	40,7	40,9	40,0	38,9	39,1	33,1	37,6	37,1
Klv250398	19,4	18,2	20,6	21,0	23,0	19,2	21,5	17,0	18,3	16,2		41,3	43,4	44,0	45,5	43,7	43,0	41,0	36,2	37,9	37,3
Klku160492	20,5	19,6	20,2	21,4	22,2	21,8	22,1	17,5	19,0	20,4		24,6	24,5	25,4	26,3	25,3	25,0	25,7	22,3	24,0	23,4
Klne180499	21,0	24,6	18,6	22,1	21,2	20,0	22,9	18,6	19,3	21,3		41,3	42,3	42,2	45,3	43,8	43,6	40,5	36,9	38,0	39,4
Klck260996	27,2	30,1	29,0	27,7	30,6	25,6	28,9	25,0	26,8	20,8		43,8	44,4	45,0	45,9	45,3	45,4	44,2	39,1	42,2	42,3
Klmr231091	15,2	15,2	16,7	17,3	17,5	16,9	16,8	13,0	16,3	7,5		10,3	11,3	10,1	10,9	9,3	9,8	10,7	7,9	11,1	11,8
Klnl190493	26,2	25,6	28,0	27,5	27,5	28,3	25,2	22,9	24,3	26,3		25,4	24,1	27,9	28,0	27,7	24,0	26,8	22,5	24,7	23,0
Klnn260496	22,6	26,4	26,0	25,4	25,8	25,5	23,7	21,4	6,4	22,9		33,4	31,9	34,8	35,2	35,3	36,0	34,1	29,8	31,7	31,3
Klra011096	21,1	18,4	23,2	22,6	23,1	21,4	24,2	18,2	19,1	19,5		33,7	33,5	35,6	35,6	35,1	35,2	34,0	30,1	31,8	32,1
Klne280398	27,5	27,3	27,8	28,6	29,5	29,3	27,4	23,2	26,1	27,9		22,5	21,5	22,4	23,5	22,9	24,1	23,3	20,0	22,4	22,0
Klnh081294	28,1	28,5	28,8	28,1	29,3	30,2	28,3	24,4	27,9	27,4		14,7	13,7	16,0	15,7	16,9	14,1	16,6	13,4	13,2	12,4
Klre080104	19,5	16,0	21,1	20,5	21,0	21,7	22,1	15,5	17,5	20,1		8,9	9,3	9,2	9,7	9,0	9,3	9,1	6,9	9,1	8,1
Klve280700	19,2	18,4	19,4	21,2	21,5	21,2	22,3	15,9	19,1	13,4		33,7	34,6	35,2	35,3	34,4	34,7	34,1	29,9	32,9	32,4
Klkh300705	15,3	14,2	17,9	16,2	18,3	13,5	18,6	13,8	14,0	11,1		22,4	22,6	24,2	23,9	24,8	22,4	23,7	20,4	21,2	18,4
Klin180900	27,8	28,5	29,2	28,3	28,8	28,3	29,5	23,5	26,0	28,0		23,8	24,6	26,5	24,5	24,2	23,9	24,8	20,4	23,2	22,7
Klbo081201	28,5	25,7	30,0	28,7	28,2	35,2	29,7	23,0	26,5	29,1		25,3	24,8	25,9	28,2	27,3	26,1	25,8	22,2	24,1	23,2
Klzl311009	28,2	24,0	29,2	30,3	30,8	31,2	30,9	22,9	25,9	28,7		4,1	4,1	0,0	4,9	0,0	0,0	22,6	5,8	0,0	0,0
Klna291009	26,7	26,4	27,7	27,3	32,5	27,8	27,5	22,2	23,9	24,9		13,4	14,6	12,8	13,4	13,5	13,2	15,0	11,4	13,8	12,6
Klne090197	11,7	12,6	12,5	13,4	12,0	12,2	12,5	9,8	10,6	9,7		41,6	43,9	42,1	44,2	42,6	43,5	42,5	35,6	40,3	39,8
Klan101109	23,2	24,0	25,9	25,3	26,1	22,8	25,9	20,6	21,4	16,4		26,6	30,4	25,5	31,2	26,0	29,3	29,0	20,8	25,4	21,6
Klnu201109	31,6	31,0	35,0	36,4	36,6	34,2	36,0	15,7	28,8	30,7		32,4	35,2	35,2	34,7	35,1	36,5	37,1	29,5	34,7	13,2
Klye200406	27,1	28,6	27,9	27,6	30,8	26,7	28,3	24,3	26,4	23,5		24,9	26,4	25,0	26,0	24,4	24,9	26,6	21,4	25,2	24,3
Klte210310	16,7	16,5	19,9	17,4	19,1	16,4	18,7	14,9	15,6	11,4		17,4	19,3	16,8	17,1	17,9	17,9	20,0	14,3	16,7	16,6
Klna120909	28,8	27,1	30,7	31,1	32,0	32,0	31,2	24,7	28,0	22,2		19,0	19,7	19,4	21,2	19,4	18,1	21,4	16,4	19,2	16,0
Klnß270610	24,2	26,3	23,6	26,9	25,1	24,6	25,0	20,7	23,0	22,7		28,2	29,2	28,5	29,5	28,4	29,4	28,9	24,5	28,1	27,1
Klru280204	17,5	18,5	18,6	19,1	17,9	15,4	17,3	15,7	16,8	17,5		10,9	14,5	9,9	10,2	10,9	11,4	12,5	7,6	10,6	10,2
Klnl090606	25,3	21,7	26,8	27,0	28,4	27,8	26,8	20,6	23,4	24,8		12,8	15,6	12,5	13,3	13,0	12,7	15,7	10,9	12,3	9,2
Kly1x20810	23,9	22,3	25,9	24,4	26,7	27,3	25,9	21,2	20,9	20,9		15,2	13,7	16,6	16,7	18,6	14,4	17,7	14,8	14,4	9,6
Klro10509	28,3	29,0	29,2	29,7	29,5	30,8	27,2	24,1	26,6	28,5		33,2	31,9	35,9	35,2	35,8	35,0	34,1	29,0	31,6	30,7
Klnh151209	29,6	30,0	30,5	31,0	30,6	31,1	29,7	25,0	27,8	30,3		28,8	27,8	31,0	31,6	30,9	31,1	30,2	25,6	25,1	26,1
Klnn211209	13,0	13,0	12,7	13,6	14,5	15,0	14,3	9,5	12,9	11,2		34,8	31,9	37,0	36,0	36,1	35,0	36,7	30,6	35,0	34,7
Kltn160703	28,2	27,2	30,0	30,0	30,7	28,3	29,9	24,9	25,8	26,8		11,7	12,1	11,6	11,6	12,3	12,2	12,6	9,7	12,0	11,1
Klve100310	28,1	29,3	29,1	31,3	29,3	28,1	29,9	23,6	26,9	26,0		28,4	27,0	29,7	31,5	31,1	30,3	28,4	24,9	26,4	26,2
Klnc240410	11,7	12,7	10,7	12,3	12,7	11,8	13,3	10,5	11,5	9,8		27,9	27,4	29,9	30,0	30,1	29,7	28,0	23,9	26,3	25,8
Kldm150902	27,9	28,1	28,8	29,4	29,8	30,0	27,4	23,3	25,7	28,8		35,7	35,4	38,2	38,7	39,1	36,4	36,9	30,3	33,4	32,9
Klde120499	24,2	24,2	25,3	26,0	25,9	23,9	26,4	21,4	22,9	22,0		27,1	26,0	28,9	29,5	29,3	28,0	27,3	23,0	25,7	26,1
Klir210402	16,8	17,6	16,3	17,1	17,5	18,2	18,2	14,0	16,2	15,6		26,4	26,0	27,1	30,7	28,9	28,3	27,8	22,5	23,4	22,6
Klrb040497	23,3	26,8	26,4	4,7	27,1	28,9	25,3	22,0	23,4	25,1		22,4	19,6	24,1	22,0	25,2	23,0	23,8	20,2	21,8	21,8
Klmd040898	12,6	12,9	14,5	12,7	15,5	11,7	13,9	12,1	11,5	8,9		30,5	24,1	29,8	34,5	34,0	32,2	33,9	25,2	27,4	33,6
Klod300802	7,8	11,5	7,4	8,6	9,1	7,0	9,5	6,5	6,9	3,3		22,5	20,8	22,3	22,6	24,7	23,6	26,3	19,7	21,3	21,5
Klne100999	23,2	26,6	22,4	25,1	24,1	23,6	22,4	20,1	22,0	22,3		29,4	26,6	27,7	32,0	32,6	35,3	29,0	24,5	27,7	28,8
Klee120498	19,6	20,6	19,6	21,8	19,1	19,7	20,9	15,8	19,2	19,7		13,8	17,6	13,4	12,6	18,0	12,2	15,0	14,5	14,2	6,8
Klhb110597	16,9	17,8	17,0	17,4	17,7	18,2	17,7	13,4	16,5	16,3		32,5	32,4	32,8	33,7	35,2	34,4	31,9	28,0	31,0	33,4
Klmo120102	18,4	16,9	20,1	20,9	21,6	17,1	20,2	16,6	17,4	14,7		28,0	27,8	28,4	29,7	30,7	32,3	26,2	24,0	26,4	26,5
Klca020702	23,7	25,3	21,3	26,7	23,9	23,1	24,0	21,0	24,3	23,7		29,6	29,3	30,6	31,0	33,9	31,5	26,8	26,9	27,5	28,8
Klna010999	33,2	30,9	34,5	35,1	36,2	34,7	35,6	29,6	31,3	30,9		19,7	16,5	18,6	21,9	22,8	21,5	21,0	17,0	17,9	20,2
Kler040398	27,8	27,2	29,0	30,3	28,6	30,0	29,8	21,9	26,8	26,3		26,5	24,3	26,2	28,7	29,9	28,8	27,1	21,6	24,9	26,7

Kontrollen

Methylierungsergebnisse der SGA- und der Kontrollgruppe des Genortes H19_6CTCF. Die erste Spalte eines Genortes zeigt den Mittelwert einer Probe (MW), jede weitere Spalte steht für einen einzelnen CpG, jede Zeile stellt eine analysierte Probe dar. Methylierungswerte in % Methylierung.

Tabelle 19: Methylierungswerte des Genortes IGF2 11p15

SGA	MW	CpG 4	CpG 5	CpG 6		MW	CpG 4	CpG 5	CpG 6
Klen190400	45,3	41,1	50,3	44,5	Kontrollen	40,8	44,7	37,7	40,0
Klci140795	40,8	45,4	40,1	36,8		41,6	45,9	40,3	38,6
Klly111097	41,3	43,4	44,3	36,3		42,5	41,6	43,2	42,6
Klmh180596	49,4	47,9	50,8	49,7		42,9	46,9	41,2	40,6
Klvi250398	44,1	43,8	51,2	37,3		41,5	42,3	42,3	39,7
Klku160492	47,7	45,9	51,0	46,3		48,2	50,7	47,7	46,1
Klne180499	50,6	47,1	54,8	49,8		38,6	40,6	37,5	37,8
Klck260996	47,3	42,2	53,3	46,3		44,7	49,2	44,6	40,3
Klmr231091	42,7	43,7	46,9	37,3		44,9	47,2	44,4	43,2
Kinl190493	40,0	43,1	41,5	35,6		40,0	36,6	42,1	41,5
Klnt260496	51,3	50,6	53,5	49,8		41,4	48,0	40,6	35,7
Klra011096	49,8	47,9	51,2	50,2		43,0	47,8	38,8	42,3
Klne280398	40,8	44,7	43,0	34,7		44,2	48,4	43,7	40,4
Klnh081294	46,0	44,6	51,8	41,7		41,6	41,7	43,0	40,2
Klre080104	46,2	50,3	46,7	41,6		41,9	43,6	43,3	39,0
Klvs280700	47,2	47,4	50,3	44,1		40,8	44,5	40,2	37,6
Klkh300705	47,0	45,7	52,4	43,0		39,8	42,3	38,1	39,2
Klin180900	46,5	50,5	48,1	41,1		42,7	46,1	41,6	40,5
Klbo081201	44,6	42,8	50,8	40,3		31,2	35,2	28,2	30,3
Klzl311009	51,5	50,7	58,0	45,9		43,7	45,4	43,5	42,3
Klna291009	52,1	53,4	56,9	46,1		48,4	54,9	49,1	41,1
Klne090197	39,3	40,1	42,6	35,1		46,9	49,2	52,3	39,2
Klan101109	49,2	46,7	54,2	46,6		48,3	47,2	47,8	50,0
Klnu201109	46,5	48,9	48,9	41,6		50,8	55,9	52,8	43,6
Klye200406	49,4	49,9	50,1	48,2		49,6	50,7	55,9	42,2
Klte210310	46,6	44,5	50,7	44,7		48,8	45,5	55,3	45,4
Klna120909	39,2	44,1	38,2	35,3		51,6	52,6	51,8	50,5
Klnf5270610	43,6	42,8	47,2	40,8		46,4	48,6	48,0	42,6
Klru280204	46,1	45,2	50,9	42,2		51,7	52,2	54,8	48,1
Klnl090606	43,6	48,5	42,0	40,3		58,4	62,1	61,6	51,6
Kly1x20810	40,9	41,7	45,0	36,0		43,6	46,0	41,7	43,1
Klrr010509	48,9	47,5	53,4	45,9		41,5	45,1	40,6	38,7
Klnh151209	43,2	43,6	47,2	38,7		44,8	44,7	50,6	39,2
Klnt211209	48,7	50,5	51,1	44,5		31,3	33,7	30,6	29,6
Kltn160703	49,7	47,2	55,0	46,9		37,3	41,5	36,8	33,6
Klve100310	45,6	46,7	49,0	41,0		39,4	43,4	38,7	36,0
Klnc240410	50,2	52,0	52,7	46,0		43,9	40,9	46,2	44,5
Kldm150902	50,5	50,0	53,9	47,5		42,7	43,2	42,7	42,3
Klde120499	47,3	45,7	52,7	43,6		40,9	42,5	42,1	38,0
Klrl210402	48,8	48,6	52,3	45,5		35,0	38,5	33,0	33,4
Klrb040497	48,3	45,5	52,2	47,3		49,9	52,6	51,1	46,1
Klmd040898	45,9	45,9	48,3	43,5		45,7	46,4	49,5	41,1
Klod300802	59,5	60,8	62,3	55,5		51,7	54,0	56,8	44,5
Klne100999	45,1	46,0	47,4	41,7		51,7	53,7	51,9	49,5
Klee120498	41,7	42,3	43,9	38,9		49,2	54,3	48,6	44,9
Klbh110597	43,3	43,7	45,7	40,4		53,0	50,3	60,3	48,6
Klmo120102	47,5	48,7	51,5	42,4		48,0	47,4	56,3	40,4
Klca020702	42,8	43,4	46,1	38,9		51,6	52,6	56,4	45,9
Klna010999	42,4	55,7	37,9	33,5	51,9	53,5	53,7	48,5	
Kler040398	46,6	45,8	50,7	43,2	44,3	47,4	45,4	40,0	

Methylierungsergebnisse der SGA- und der Kontrollgruppe des Genortes IGF2. Die erste Spalte eines Genortes zeigt den Mittelwert einer Probe (MW), jede weitere Spalte steht für einen einzelnen CpG, jede Zeile stellt eine analysierte Probe dar. Methylierungswerte in % Methylierung.

Tabelle 20: Methylierungswerte des Genortes MEG3 14q32

SGA	MW	CpG 20	CpG 19	CpG 18	CpG 17	CpG 16	CpG 15	CpG 14	CpG 13	CpG 12	CpG 11		MW	CpG 20	CpG 19	CpG 18	CpG 17	CpG 16	CpG 15	CpG 14	CpG 13	CpG 12	CpG 11
Klen190400	41,5	45,3	57,8	42,0	41,3	27,6	41,1	41,9	42,0	40,5	36,1		44,3	47,4	73,7	48,3	44,7	21,0	40,9	44,5	46,6	35,1	41,2
Klci140795	36,9	40,3	59,1	40,0	27,5	19,6	35,7	38,4	39,1	34,1	35,6		46,9	47,3	66,2	45,8	41,5	39,2	42,7	45,7	51,7	45,2	43,9
Klmy111097	36,4	40,0	61,9	36,7	36,8	19,5	33,8	35,1	37,3	30,2	32,3		34,1	38,1	53,6	33,4	32,6	24,5	28,6	34,2	34,8	29,5	31,9
Klmh180596	36,3	39,9	63,1	37,9	36,9	18,1	35,1	35,7	31,9	30,9	33,8		41,7	44,0	58,5	41,4	41,4	31,5	37,9	39,3	41,3	38,0	43,6
Klm250398	30,4	35,3	52,5	35,2	31,8	19,9	30,5	32,0	34,2	0,0	32,6		41,7	42,8	57,4	44,1	40,2	25,6	48,0	43,6	40,3	35,3	39,8
Klku160492	32,1	32,0	51,5	31,6	27,9	19,3	30,3	34,6	33,8	29,6	30,6		35,3	35,7	50,7	33,7	34,2	27,0	30,2	35,5	38,5	31,8	35,5
Kline180499	46,1	50,9	66,1	51,6	45,7	24,3	45,1	46,8	47,3	40,7	42,5		33,3	36,5	47,6	34,2	31,7	24,2	28,4	33,8	36,1	28,1	32,9
Klck260996	43,1	46,7	64,5	45,6	43,1	26,8	41,0	42,6	43,6	37,8	39,4		42,1	45,9	62,4	47,9	40,9	21,9	41,4	40,9	42,6	34,8	41,9
Klmr231091	37,3	39,6	56,9	40,7	37,6	18,3	35,8	34,3	40,5	32,7	35,9		39,1	41,8	56,4	38,3	37,3	31,4	34,4	34,3	39,7	34,3	42,9
Kinl190493	33,6	39,9	58,8	4,7	32,7	22,1	34,4	37,3	39,7	30,6	36,0		37,8	42,1	59,1	37,2	37,2	30,6	33,1	35,5	36,4	34,2	32,9
Kinn260496	45,4	44,6	63,2	45,0	44,5	36,2	42,7	42,8	49,0	43,8	42,4		33,1	36,7	52,7	31,5	29,8	24,4	27,6	34,4	34,3	26,8	32,9
Klra011096	34,4	39,4	51,4	34,9	32,8	20,3	31,3	34,8	35,3	32,0	31,6		36,2	38,7	51,2	35,3	36,3	29,6	31,8	35,8	37,0	34,1	32,7
Kline280398	34,1	37,4	53,8	36,7	31,5	20,9	29,7	35,4	34,7	28,6	32,7		41,8	45,8	65,6	42,4	38,7	35,6	35,0	37,3	41,9	39,4	36,7
Klnh081294	34,9	39,0	52,7	37,3	39,5	18,6	35,8	37,1	24,8	31,2	32,7		38,7	39,5	54,3	38,4	40,8	29,6	32,7	36,9	42,8	36,5	35,3
Klire080104	44,3	50,5	72,0	47,6	44,3	23,9	40,5	41,0	46,4	38,2	38,7		38,2	41,1	56,0	39,4	37,3	28,8	32,3	35,0	40,2	36,0	35,7
Klvs280700	42,2	45,1	68,3	45,9	42,8	20,1	41,4	43,1	43,0	32,9	39,3		35,1	38,6	55,0	35,9	32,5	20,1	30,1	36,2	36,4	31,2	35,4
Klkh300705	41,6	45,0	64,7	44,5	39,9	24,6	40,8	40,5	41,2	37,8	37,1		41,1	42,0	62,0	41,3	40,3	33,2	35,3	37,5	40,6	39,0	39,4
Klin180900	44,6	48,8	70,7	48,2	43,0	25,6	43,1	43,4	45,6	36,7	41,2		39,9	41,9	58,3	45,4	38,7	19,9	42,5	40,9	41,7	31,3	38,5
Klbo081201	41,0	46,1	62,6	43,4	41,2	25,5	35,5	40,5	40,2	38,0	37,1		32,2	32,8	46,0	33,4	30,9	19,8	25,5	37,9	36,6	26,1	32,6
Klzl311009	36,1	41,0	56,5	34,5	36,6	27,4	30,3	32,5	36,5	33,0	32,4		27,8	28,3	46,3	26,2	24,7	19,2	22,8	30,6	30,0	21,8	28,2
Klna291009	44,9	49,8	63,5	46,3	45,8	28,8	42,2	46,2	45,2	38,8	42,2		41,6	41,0	48,8	50,1	44,8	28,4	40,6	42,1	46,4	33,3	40,7
Kline090197	38,1	40,4	56,5	39,6	39,2	22,5	36,9	37,9	41,5	35,1	31,9		45,6	47,0	56,6	55,2	51,9	24,5	48,2	48,9	47,0	28,1	48,6
Klan101109	46,0	49,5	62,0	51,2	48,2	24,6	46,0	47,3	45,7	40,1	46,0		36,4	40,8	51,6	43,4	39,1	18,0	36,2	38,4	35,9	24,8	36,4
Klnu201109	31,7	43,5	61,9	37,9	40,2	25,9	34,5	34,8	6,3	32,6	0,0		39,8	41,7	51,7	47,2	42,7	26,5	38,4	38,5	44,5	28,7	38,2
Klye200406	38,4	38,4	72,5	35,5	38,2	25,7	31,9	35,2	38,1	33,6	34,5		39,7	44,0	56,5	44,7	39,0	24,9	36,6	40,4	41,3	30,3	39,4
Klte210310	43,0	47,6	66,7	45,4	44,4	25,3	37,2	39,8	47,5	37,6	38,5		35,7	38,7	46,8	39,7	35,5	23,6	33,3	39,2	35,4	29,9	35,0
Klina120909	39,7	41,9	62,7	42,1	40,7	20,6	37,9	40,3	41,1	34,2	35,3		47,2	50,2	64,2	52,9	46,5	34,0	43,5	46,1	50,9	39,0	44,9
Klnß270610	32,9	37,9	59,7	37,5	36,1	18,1	33,6	17,6	35,6	20,7	32,2		42,7	42,5	54,7	48,4	41,9	31,3	42,1	43,8	44,3	34,4	43,9
Klru280204	11,7	8,7	31,6	7,1	10,9	10,0	8,3	7,9	14,8	12,8	5,1		46,6	52,7	64,4	51,5	46,0	35,9	43,5	45,8	49,2	34,2	43,1
Klin090606	36,2	35,9	55,7	37,0	36,7	21,5	32,7	35,5	39,0	34,4	33,9		40,7	45,6	56,4	45,8	40,2	27,8	37,7	44,7	41,3	33,2	34,7
Kly1x20810	39,7	41,2	63,9	39,6	40,4	20,8	36,0	39,1	42,6	36,2	37,0		40,6	41,4	62,5	41,6	39,8	29,5	36,1	39,1	41,3	38,2	37,0
Klro10509	39,8	39,9	63,1	39,1	41,9	14,6	37,8	53,4	41,1	31,0	36,5		45,3	46,8	63,3	44,9	44,5	37,0	39,5	42,2	48,4	45,4	40,7
Klinh151209	41,9	46,8	64,6	47,5	42,9	20,3	42,0	40,5	42,3	34,3	37,9		32,2	36,3	48,8	32,0	29,3	23,1	25,5	34,0	35,4	26,6	31,4
Klrm211209	43,5	51,6	63,9	47,5	44,5	22,9	42,3	43,3	42,3	36,4	40,4		41,7	43,6	62,5	50,2	40,9	21,0	41,0	42,1	42,5	34,1	39,6
Klrm160703	34,9	38,7	57,9	34,3	30,8	23,4	30,8	33,0	36,2	31,5	32,8		42,1	43,9	60,8	40,9	42,3	34,6	36,9	39,0	45,9	40,4	36,2
Klve100310	37,2	39,2	57,9	39,1	37,7	19,0	35,0	37,1	36,6	32,0	38,7		41,6	41,9	62,3	41,5	43,2	32,3	37,3	38,2	42,7	39,1	38,0
Klnc240410	40,2	44,2	56,5	43,6	40,8	21,9	37,7	41,1	42,7	35,1	38,2		52,5	61,0	78,1	56,7	54,7	28,4	47,2	49,6	57,6	45,3	46,6
Kldm150902	41,0	44,4	55,7	44,8	40,1	23,1	41,0	41,1	41,3	37,1	41,0		39,8	43,5	55,5	41,0	39,0	32,1	34,5	37,1	41,3	36,5	37,3
Klde120499	35,9	37,7	59,3	35,1	37,5	20,4	31,8	34,7	36,9	32,5	33,5		44,3	45,1	61,9	43,5	45,8	38,7	37,9	38,6	44,6	44,6	42,1
Klrf210402	38,0	41,1	60,9	38,7	34,3	23,6	34,0	38,3	40,0	32,7	36,4		43,3	47,2	63,6	43,3	42,4	30,8	38,1	42,0	44,4	39,6	41,2
Klrb040497	41,5	44,9	66,6	42,4	41,1	20,3	38,5	40,6	45,5	36,0	38,6		42,7	51,5	72,7	43,8	43,2	22,6	37,4	42,1	44,8	33,0	36,2
Klmd040898	43,4	48,3	62,5	47,5	43,4	22,9	43,6	45,9	43,4	36,3	40,3		30,3	33,9	47,4	30,8	26,8	15,6	29,6	29,9	32,5	25,3	31,6
Klod300802	41,8	45,4	68,3	43,7	43,5	22,8	39,4	41,6	43,4	33,6	36,1		39,8	45,8	54,3	42,2	41,0	21,1	37,9	39,2	44,0	34,1	39,0
Kline100999	38,0	42,6	65,5	37,8	36,7	20,5	32,9	36,0	39,4	33,2	35,1		38,4	40,6	60,4	41,8	39,7	19,3	38,5	37,5	38,8	32,3	35,4
Klee120498	36,7	37,8	57,5	37,7	34,9	23,6	33,2	35,8	38,0	35,2	33,7		45,3	46,0	71,4	50,6	42,7	19,8	40,6	40,1	50,3	40,9	50,9
Klfb110597	40,4	43,7	56,5	42,9	42,0	24,8	39,2	38,6	41,5	36,6	38,8		37,2	42,6	58,3	39,2	36,3	17,4	35,2	36,6	39,4	31,4	36,1
Klmo120102	47,8	56,9	84,9	50,8	47,1	24,8	40,0	42,1	51,8	40,0	40,0		27,4	31,5	47,5	29,9	24,1	11,5	24,4	24,4	28,8	25,0	27,2
Klca020702	39,5	43,0	55,2	41,1	41,6	22,7	36,3	39,0	41,8	36,8	37,3		34,6	35,5	65,0	34,8	37,4	17,8	33,2	32,7	31,5	29,5	28,4
Kina010999	29,4	35,8	57,6	38,4	35,5	16,7	33,3	0,0	33,8	11,3	32,2		38,2	43,7	62,6	42,2	38,8	17,1	36,8	35,7	40,2	29,3	35,9
Kler040398	37,1	39,3	59,5	37,2	40,8	25,1	36,6	22,0	40,0	35,5	35,1		42,6	48,4	66,5	47,1	48,4	21,5	38,8	41,2	42,3	32,4	39,7

Kontrollen

Methylierungsergebnisse der SGA- und der Kontrollgruppe des Genortes MEG3. Die erste Spalte eines Genortes zeigt den Mittelwert einer Probe (MW), jede weitere Spalte steht für einen einzelnen CpG, jede Zeile stellt eine analysierte Probe dar. Methylierungswerte in % Methylierung.

Tabelle 21: Methylierungswerte des Genortes NDN 15q11

SGA	MW	CpG 22	CpG 21	CpG 20	CpG 19	CpG 18	CpG 17	CpG 16	CpG 15	Kontrollen	MW	CpG 22	CpG 21	CpG 20	CpG 19	CpG 18	CpG 17	CpG 16	CpG 15
Klen190400	53,2	45,5	50,1	52,4	49,5	54,9	60,3	46,6	66,2		50,7	39,0	46,5	45,7	46,4	59,2	55,8	45,9	66,8
Klci140795	43,1	42,8	43,4	45,7	39,3	29,0	47,1	35,9	61,8	53,1	45,7	56,4	56,9	45,8	56,7	61,4	44,5	57,2	
Klly111097	47,7	40,1	47,2	51,3	41,0	49,6	54,2	37,3	60,7	45,5	32,1	45,6	46,5	36,6	51,3	52,5	40,7	58,5	
Klmh180596	55,0	52,9	54,9	56,2	49,0	55,9	62,3	48,0	60,8	50,4	38,8	51,3	51,2	41,4	56,3	56,0	43,8	64,8	
Klvi250398	45,5	36,6	45,8	51,3	33,2	52,9	53,5	35,3	55,5	44,3	25,5	43,9	41,0	33,4	57,4	54,6	40,3	58,2	
Klku160492	49,3	40,0	50,3	46,2	37,2	53,7	60,9	46,5	59,9	48,8	42,2	42,5	47,7	34,0	55,2	56,9	46,6	65,0	
Kline180499	50,8	44,9	46,6	52,2	42,3	54,0	57,5	45,0	64,0	44,3	32,4	40,3	42,9	34,2	54,6	50,3	42,6	56,8	
Klck260996	46,3	40,3	44,5	45,1	37,4	54,7	52,4	37,5	58,9	44,3	37,8	43,0	37,4	34,5	49,2	49,4	44,0	59,0	
Klmr231091	39,8	29,5	37,6	40,0	32,2	47,0	47,0	32,8	52,6	47,1	37,7	46,9	46,2	47,5	51,9	54,4	38,2	53,7	
Kini190493	51,3	39,9	50,0	50,4	47,1	56,8	59,4	44,7	62,1	47,4	35,4	43,0	44,9	41,0	53,8	54,9	44,5	61,5	
Kinn260496	51,8	42,5	47,6	47,9	46,1	59,0	56,6	51,7	63,3	49,8	45,1	47,6	49,6	36,8	60,8	51,1	45,1	62,0	
Klra011096	51,6	45,0	50,4	50,9	40,1	54,5	60,3	46,3	65,1	46,8	34,4	45,8	50,3	44,8	54,3	48,4	35,8	60,2	
Kline280398	55,1	49,2	54,5	56,3	42,9	56,9	64,4	49,7	66,6	47,1	38,1	47,5	46,3	44,4	48,8	52,2	40,1	59,6	
Klnh081294	36,3	32,7	36,4	39,9	32,2	45,5	46,4	31,5	25,4	54,2	46,3	52,2	50,6	44,3	59,9	60,0	50,2	70,1	
Klre080104	56,8	46,2	54,0	56,7	51,0	62,7	61,5	50,6	71,5	46,1	41,7	44,9	40,3	37,7	50,8	53,0	42,6	57,6	
Klvs280700	48,3	45,1	43,0	44,2	46,6	49,7	54,7	39,7	63,5	48,6	40,9	47,6	51,2	36,1	49,9	56,5	44,0	63,0	
Klkh300705	40,4	33,0	39,9	39,4	30,5	44,1	46,9	32,2	57,0	46,2	36,0	46,6	45,9	43,0	52,9	52,6	36,3	56,7	
Klin180900	42,4	28,6	42,6	43,9	40,1	50,5	47,5	30,5	55,5	43,9	36,5	40,8	42,4	33,4	53,6	49,0	39,0	56,3	
Klbo081201	47,0	37,5	43,2	42,6	39,7	56,1	57,0	40,5	59,4	45,2	30,8	45,8	34,5	49,3	63,0	41,2	34,8	62,0	
Klzi311009	50,0	43,0	45,6	45,9	44,8	57,4	54,5	44,3	64,5	44,1	25,6	41,8	44,9	36,4	53,5	51,3	41,8	57,6	
Klna291009	50,6	39,8	47,8	48,6	44,1	59,7	57,1	43,3	64,8	48,0	42,1	46,6	50,9	33,0	52,8	51,2	49,0	58,6	
Kline090197	51,0	44,7	50,3	55,5	45,2	49,8	58,2	45,3	59,2	46,8	38,9	40,1	44,2	43,6	53,8	52,2	40,8	60,5	
Klan101109	54,6	40,8	47,1	46,3	42,7	52,0	83,9	60,5	63,2	48,7	38,3	45,9	48,6	38,2	55,1	54,6	48,5	60,4	
Klnu201109	50,2	43,0	50,0	52,7	40,2	51,2	59,4	42,4	62,6	49,5	39,4	46,6	49,7	45,2	56,4	54,3	44,3	60,3	
Klye200406	45,2	35,1	44,4	46,7	34,6	49,7	53,4	38,8	58,9	44,1	34,1	43,0	43,3	33,4	46,7	49,6	45,7	56,9	
Klte210310	53,3	44,7	49,7	49,2	46,2	56,9	58,6	52,6	68,4	37,3	25,7	41,8	41,1	25,2	44,6	46,0	31,4	42,4	
Klna120909	49,9	45,3	42,0	47,1	42,6	53,5	58,3	44,3	65,9	45,1	36,9	36,3	46,2	37,9	50,3	54,2	47,9	50,9	
Klnb270610	47,0	36,5	42,1	44,5	38,9	53,0	54,1	44,2	62,6	44,9	34,2	44,1	48,8	38,3	40,6	52,4	48,9	51,6	
Klrz280204	45,6	34,5	43,6	42,6	39,9	52,2	54,1	38,6	59,6	48,8	35,4	47,4	46,6	44,3	52,4	57,0	44,0	63,2	
Klni090606	44,3	39,2	43,0	43,2	35,3	47,5	47,4	39,2	59,2	46,6	33,5	41,7	44,5	41,6	56,3	50,7	45,6	58,9	
Kly1x20810	50,1	43,0	44,4	51,9	43,4	56,0	57,4	42,6	62,0	40,5	26,4	35,3	42,1	41,3	50,1	46,9	33,6	48,7	
Klrr010509	38,2	30,4	34,6	39,3	31,4	44,2	45,8	28,7	51,1	53,2	47,3	51,1	52,0	40,9	61,8	59,1	43,8	69,4	
Klnh151209	50,1	41,8	50,2	47,2	36,0	55,0	56,7	48,1	65,8	52,4	34,9	47,0	37,9	56,5	63,6	56,8	48,6	73,6	
Klnn211209	46,7	36,4	43,0	40,2	39,7	58,3	54,0	42,2	59,9	44,2	33,3	43,5	42,2	37,0	53,6	45,1	39,7	58,8	
Kln160703	41,0	29,0	38,4	43,4	32,6	46,1	48,7	34,6	55,1	46,9	39,6	46,1	44,4	40,7	55,8	47,8	41,9	59,1	
Klve100310	51,3	46,4	48,8	51,9	38,1	51,3	66,4	46,1	61,1	54,9	42,3	51,6	52,7	48,3	61,2	58,6	57,2	67,6	
Klnc240410	40,2	28,0	41,7	37,9	34,2	49,7	47,3	30,0	52,7	45,4	26,9	31,9	50,1	31,2	61,0	53,7	42,6	66,0	
Kldm150902	46,6	38,0	45,5	48,3	39,7	49,1	54,1	37,9	60,6	46,0	32,4	47,8	47,9	43,1	49,4	53,4	40,4	53,8	
Klde120499	44,2	36,4	38,4	45,6	37,6	48,7	50,8	39,8	56,6	45,7	34,6	47,4	48,4	35,3	47,6	51,9	40,3	60,0	
Klrl210402	50,3	45,2	48,5	51,7	39,5	53,3	59,2	41,4	63,9	52,7	37,4	52,6	49,7	42,3	66,1	56,6	47,0	69,6	
Klrb040497	50,3	45,5	46,1	50,0	36,5	58,1	55,5	44,1	66,8	59,0	49,3	60,8	48,0	56,6	68,4	66,8	56,0	66,3	
Klmd040898	41,5	32,2	38,5	43,7	30,3	47,0	49,9	35,6	54,8	53,1	44,4	51,8	46,8	43,8	64,8	61,1	46,4	65,9	
Klod300802	48,3	40,7	46,2	44,7	39,2	56,3	56,3	34,9	68,3	46,3	30,3	48,3	49,0	33,0	49,3	57,0	46,7	56,7	
Kline100999	46,5	33,9	43,9	45,9	37,7	53,0	53,0	45,4	59,3	47,7	38,9	42,8	44,9	46,4	56,9	49,9	37,8	64,4	
Klee120498	45,5	40,4	44,2	42,7	34,5	53,1	50,1	41,1	58,0	50,1	45,6	57,0	46,1	40,0	52,0	55,4	42,8	61,6	
Klhb110597	48,6	39,2	43,7	48,4	41,5	56,9	54,6	42,9	61,9	49,8	31,0	46,1	42,3	51,2	55,3	57,1	47,4	68,2	
Klmo120102	62,8	55,5	58,7	58,8	60,4	73,7	62,6	55,3	77,4	46,4	36,6	48,6	45,2	34,8	50,6	48,3	44,0	62,8	
Klca020702	40,1	33,4	37,5	36,4	33,8	45,2	48,2	32,8	53,2	32,2	38,9	34,7	35,0	26,4	25,9	35,0	34,1	27,7	
Klna010999	48,5	34,1	42,2	44,0	45,4	55,5	54,6	45,3	67,1	49,1	44,3	49,5	46,0	38,2	56,7	55,3	46,4	56,7	
Kler040398	51,3	44,4	48,2	52,5	42,1	55,5	61,4	43,5	62,9	50,9	36,6	47,2	45,3	45,5	62,1	56,5	48,0	66,4	

Methylierungsergebnisse der SGA- und der Kontrollgruppe des Genortes NDN. Die erste Spalte eines Genortes zeigt den Mittelwert einer Probe (MW), jede weitere Spalte steht für einen einzelnen CpG, jede Zeile stellt eine analysierte Probe dar. Methylierungswerte in % Methylierung.

Tabelle 22: Methylierungswerte des Genortes SNRPN 15q11

SGA	MW	CpG 20	CpG 19	CpG 18	CpG 17	CpG 16	CpG 15	CpG 14	CpG 13	CpG 12	CpG 11		MW	CpG 20	CpG 19	CpG 18	CpG 17	CpG 16	CpG 15	CpG 14	CpG 13	CpG 12	CpG 11
Klen190400	32,7	36,3	36,8	35,1	34,9	28,5	32,5	30,1	29,7	31,1	32,2		33,1	35,0	35,6	37,4	36,5	28,8	28,7	29,4	32,9	25,1	41,8
Klc1140795	33,8	37,7	38,6	34,9	36,8	30,1	33,1	31,5	28,2	32,8	34,6		38,4	39,3	43,5	42,4	42,6	35,9	35,4	34,3	38,2	30,0	42,0
Klly111097	32,9	36,6	39,0	33,9	33,8	28,6	33,1	29,7	28,4	32,6	33,1		33,4	36,4	36,3	37,0	37,1	31,8	28,9	28,1	32,3	27,3	38,4
Klmh180596	34,3	37,9	39,9	35,9	35,8	30,9	33,7	30,9	30,1	33,5	34,6		32,8	34,9	36,4	37,0	37,1	31,0	28,5	28,6	31,5	25,9	36,8
Klm250398	34,0	36,4	38,7	33,6	36,7	33,0	32,1	31,4	29,8	32,4	35,5		33,0	37,3	36,2	36,1	36,0	31,2	27,5	28,0	31,9	28,2	37,8
Klku160492	28,5	34,6	35,1	34,8	33,8	28,2	6,5	24,8	27,8	29,1	29,9		33,9	36,0	39,4	39,8	39,4	31,4	29,9	28,4	32,7	27,2	34,7
Kline180499	31,9	34,3	34,9	29,6	35,0	27,7	31,5	31,8	25,2	33,1	35,4		32,8	36,1	34,9	34,2	35,5	33,0	28,4	28,9	31,7	30,5	34,5
Klck260996	32,5	36,5	35,2	33,9	38,5	28,8	33,0	30,0	29,4	26,2	33,4		42,8	44,2	48,2	46,8	45,3	39,1	39,8	38,6	42,1	40,6	43,3
Klmr231091	33,6	36,7	36,2	36,8	34,0	29,0	34,1	30,9	31,8	32,1	34,1		32,8	34,1	35,9	36,4	36,0	31,8	28,1	28,1	33,3	25,2	39,3
Kinl190493	33,9	37,6	38,7	35,6	37,1	30,9	31,9	30,8	29,6	30,2	36,6		30,7	35,6	34,8	35,3	38,0	0,0	30,6	30,8	33,9	28,0	39,7
Kinn260496	34,8	39,2	38,4	37,4	37,4	30,9	34,2	30,4	31,4	32,5	35,9		32,0	37,9	39,0	35,4	35,0	30,4	29,7	27,4	30,1	29,2	26,1
Klra011096	32,9	37,4	38,2	35,0	34,0	30,3	30,8	29,9	28,0	31,8	33,5		31,6	34,6	36,3	31,2	36,9	29,6	27,7	27,3	30,1	24,8	37,9
Kline280398	34,4	38,9	39,2	36,4	36,9	28,9	33,2	31,5	32,7	32,5	34,1		33,8	35,3	38,7	38,7	37,9	32,0	29,3	28,2	33,8	26,7	37,9
Klnh081294	36,2	41,4	42,1	39,0	38,1	31,4	33,2	31,0	34,4	34,1	37,7		36,4	40,7	40,1	40,5	40,6	33,8	31,4	31,7	34,7	29,3	41,7
Klire080104	32,4	37,3	35,7	33,3	34,7	28,7	32,2	28,3	30,1	29,8	33,8		32,7	34,5	36,6	36,5	38,4	31,9	27,9	27,8	32,3	26,3	34,9
Klvs280700	34,4	38,8	38,1	37,8	38,5	29,6	34,7	30,8	29,7	31,1	34,6		34,0	34,7	36,9	37,9	37,8	33,6	29,6	29,3	35,4	28,9	36,0
Klkh300705	33,1	37,7	36,5	33,3	34,1	29,2	34,4	29,3	28,0	32,4	36,3		32,2	34,8	31,5	34,2	36,1	30,8	30,1	29,4	30,5	29,6	35,4
Klin180900	37,3	39,8	44,3	40,4	38,3	38,0	34,9	33,7	31,6	35,4	36,5		28,1	28,7	30,5	30,9	32,6	28,5	24,2	22,8	27,5	25,4	30,1
Klbo081201	32,5	37,4	34,6	35,0	35,7	29,4	32,5	28,9	28,1	29,6	34,3		31,4	35,3	34,8	34,0	35,7	31,4	26,7	26,5	29,2	27,9	32,9
Klzl311009	32,6	37,4	34,3	34,4	36,5	29,0	33,2	29,3	29,2	30,2	32,5		26,8	29,0	30,0	31,5	31,3	26,2	22,6	21,6	26,0	22,0	28,0
Klna291009	37,9	40,4	42,8	41,1	38,5	35,2	38,5	35,7	32,8	36,8	37,1		38,9	40,4	43,1	41,5	42,7	45,6	32,3	31,8	36,6	34,4	41,2
Kine090197	36,0	40,5	40,5	39,9	38,7	31,8	34,6	32,6	31,8	32,7	37,1		32,8	34,4	37,5	32,3	34,9	32,1	30,2	30,0	31,2	29,8	35,7
Klan101109	28,8	33,6	33,1	29,8	30,5	22,3	29,5	25,7	25,6	27,9	29,6		36,3	39,0	41,1	40,8	42,4	37,1	32,9	31,9	38,9	18,1	40,8
Klnu201109	36,7	39,9	42,1	38,6	39,3	36,0	36,3	32,0	31,9	35,3	35,5		39,0	40,4	43,9	41,9	42,6	40,1	34,9	32,7	38,7	33,5	41,2
Klye200406	29,9	38,6	41,7	37,8	37,7	33,5	33,5	31,8	29,0	0,0	15,2		38,3	39,6	41,4	41,9	43,0	38,4	33,6	32,3	38,2	33,6	41,3
Klte210310	41,6	45,4	44,8	42,1	42,1	22,0	39,8	39,4	36,2	41,8	62,3		29,1	32,3	34,0	33,4	32,2	26,4	26,4	25,2	25,7	26,6	29,0
Klna120909	32,5	33,1	31,1	29,6	31,4	26,7	29,9	29,3	29,8	30,7	53,2		38,6	40,8	42,2	42,3	42,8	36,9	34,1	32,9	38,4	35,7	40,2
Klnß270610	33,0	36,5	37,9	35,9	33,3	31,0	32,4	29,4	28,9	31,8	32,8		36,8	39,6	42,8	39,9	40,6	34,6	33,1	31,2	35,4	32,9	37,8
Klru280204	35,7	38,8	40,7	37,4	37,6	32,1	36,9	31,4	31,7	35,5	35,2		36,5	40,1	41,7	38,4	40,3	36,6	32,9	29,6	35,4	31,8	38,0
Klin090604	34,6	39,5	38,7	36,0	37,1	30,8	33,9	32,2	30,1	32,5	35,4		38,7	38,7	40,4	40,2	40,9	33,4	33,1	32,1	34,2	34,0	60,5
Kly1x20810	31,7	34,3	36,6	34,2	32,8	29,8	31,1	30,1	27,9	30,4	30,3		48,6	51,7	55,4	52,9	52,8	46,6	44,0	44,5	46,3	43,6	48,7
Klro10509	35,2	38,7	40,8	36,7	36,4	33,1	34,7	30,5	31,5	35,0	34,3		34,6	37,3	39,8	39,5	38,4	32,0	30,0	29,3	34,7	29,3	35,5
Klnh151209	33,4	36,9	37,8	34,7	35,1	30,0	31,6	29,7	30,9	32,4	34,4		38,0	43,0	39,9	42,6	40,7	37,6	33,9	33,3	35,2	34,4	39,4
Klnn211209	36,5	39,6	39,4	39,0	38,2	28,6	32,2	29,9	31,8	31,2	55,3		27,9	30,3	31,5	30,7	31,8	26,9	24,2	23,7	26,2	25,2	28,7
Kltn160703	33,4	36,8	39,3	34,1	34,4	32,8	30,7	28,2	30,9	32,0	35,0		31,1	33,7	36,4	33,9	34,2	29,6	26,3	27,0	31,3	23,2	35,6
Klve100310	34,8	38,9	41,6	36,3	36,4	33,5	33,5	30,9	29,2	33,9	33,6		34,9	34,8	35,5	35,4	36,3	30,1	28,9	27,9	30,6	30,9	58,7
Klnc240410	32,3	39,6	34,1	34,3	35,2	28,0	33,8	29,7	28,6	28,2	32,0		33,1	36,3	37,2	38,7	37,5	32,4	28,0	28,0	31,8	27,3	33,3
Kldm150902	34,5	38,9	38,3	36,4	37,5	31,6	33,7	29,1	32,7	32,0	34,9		33,2	37,6	36,7	38,2	38,2	31,1	29,5	25,9	31,6	26,6	36,7
Klde120499	33,6	35,8	38,5	37,4	37,4	31,3	29,9	28,0	31,7	32,1	33,8		32,3	34,1	36,8	35,6	37,2	29,9	28,3	27,8	30,8	28,0	34,4
Klrl210402	40,6	46,2	46,0	36,0	41,4	35,1	47,9	38,1	39,0	38,6	37,8		34,0	38,9	38,1	38,4	38,2	32,1	30,7	29,2	31,5	28,8	34,3
Klrb040497	31,3	32,7	36,2	31,7	30,3	30,3	29,7	28,1	29,3	31,5	33,6		37,5	38,2	42,8	36,6	40,3	32,0	34,2	32,8	40,3	35,9	41,8
Klmd040898	32,3	35,9	35,5	33,8	34,9	28,8	32,9	30,7	28,5	29,0	32,9		35,7	38,4	41,0	37,3	38,6	33,6	31,9	30,4	34,2	34,6	37,1
Klod300802	33,1	35,6	35,8	35,3	35,0	28,7	33,7	30,4	32,1	33,7	31,3		35,2	34,2	39,9	37,1	37,0	31,0	34,6	31,2	33,7	35,3	37,9
Kline100999	32,9	35,9	40,3	37,4	36,4	31,3	29,0	29,2	28,7	30,7	30,6		35,8	39,2	36,9	37,5	38,0	33,9	32,3	32,2	35,7	35,6	36,3
Klee120498	36,1	38,4	43,2	38,2	38,3	34,8	33,2	31,9	31,3	35,2	36,6		34,9	35,0	37,2	40,8	34,9	30,9	32,3	30,8	39,0	33,2	34,9
Klhb110597	35,6	40,5	41,0	38,1	38,4	33,6	33,6	30,2	31,6	33,6	35,7		39,3	41,3	44,8	42,2	41,5	39,3	33,9	35,5	37,3	37,7	39,4
Klmo120102	36,1	39,6	40,5	37,6	38,1	33,8	33,9	30,1	34,2	35,6	38,1		33,0	34,4	38,1	36,7	33,6	32,5	30,1	27,1	31,2	29,9	36,7
Klca020702	32,3	36,3	37,7	33,6	33,5	28,7	33,4	28,5	27,6	31,1	32,9		28,7	28,9	33,7	33,5	32,6	23,7	28,1	23,2	28,2	25,9	28,8
Klna010999	31,6	35,2	36,7	33,7	35,4	28,2	31,1	28,0	27,7	28,4	31,7		32,7	36,6	36,5	34,9	35,0	31,0	28,8	27,8	31,7	30,5	34,7
Kler040398	36,2	33,6	36,4	35,6	35,8	30,2	30,0	28,4	30,1	31,1	70,9		33,1	36,3	39,3	35,7	35,3	28,9	28,2	28,0	32,8	30,8	35,3

Kontrollen

Methylierungsergebnisse der SGA- und der Kontrollgruppe des Genortes SNRPN. Die erste Spalte eines Genortes zeigt den Mittelwert einer Probe (MW), jede weitere Spalte steht für einen einzelnen CpG, jede Zeile stellt eine analysierte Probe dar. Methylierungswerte in % Methylierung.

Tabelle 23: Methylierungswerte des Genortes NESP 20q13

SGA	MW	CpG 11	CpG 10	CpG 9	CpG 8	CpG 7	CpG 6	CpG 5	CpG 4	CpG 3	CpG 2		MW	CpG 11	CpG 10	CpG 9	CpG 8	CpG 7	CpG 6	CpG 5	CpG 4	CpG 3	CpG 2
Klen190400	38,7	40,4	38,6	41,8	41,1	43,6	36,2	35,0	37,9	37,4	35,2		39,7	41,3	37,7	40,5	41,6	41,7	38,5	34,3	41,2	40,0	40,1
Klci140795	35,8	39,1	36,6	38,8	38,5	38,3	34,3	30,4	33,9	34,2	34,1		40,2	45,6	35,7	45,3	43,4	45,2	37,8	34,5	37,8	39,2	37,7
Klmy111097	38,4	42,3	40,6	40,8	40,5	40,4	36,8	33,0	36,2	36,5	37,0		38,3	40,2	34,7	39,0	40,7	39,2	37,5	33,3	39,5	39,3	39,0
Klmh180596	37,4	40,5	36,9	42,7	41,2	41,2	35,3	31,6	34,1	36,3	34,2		38,8	40,3	33,5	40,5	41,1	39,5	35,7	36,2	40,9	38,8	40,9
Klvi250398	35,0	37,9	31,3	35,7	39,3	38,4	32,6	28,3	36,0	34,9	35,8		37,3	39,0	35,0	37,3	40,3	39,3	35,9	32,9	39,8	35,7	38,2
Klku160492	38,5	41,3	39,0	41,2	40,4	41,0	36,7	32,7	37,9	37,9	36,9		38,3	40,6	35,8	39,7	40,7	39,7	36,3	34,8	39,4	37,9	38,1
Kline180499	38,6	40,7	39,1	42,0	40,0	41,4	36,1	33,7	39,3	36,8	36,7		39,4	41,7	36,1	40,2	41,8	40,8	38,7	34,5	42,0	38,2	39,9
Klck260996	37,8	41,4	40,5	41,1	39,0	39,7	35,2	33,7	34,8	36,5	36,3		39,4	40,9	37,0	41,8	42,5	41,4	36,8	35,9	40,0	38,4	38,9
Klmr231091	35,8	39,4	34,7	38,3	38,3	37,2	33,6	32,4	35,4	34,8	33,9		39,3	40,3	36,4	42,3	41,0	42,4	35,6	35,1	40,3	38,6	41,3
Kini190493	33,1	36,2	29,2	33,7	36,8	37,3	32,0	27,5	32,0	33,0	33,7		38,3	41,0	34,2	41,0	39,9	37,3	36,8	34,0	41,4	38,2	38,9
Kinn260496	41,6	45,6	42,8	45,3	44,6	45,1	37,0	36,2	39,3	41,2	38,8		34,6	36,2	33,9	37,3	36,3	35,5	33,4	29,8	36,7	33,8	32,9
Klra011096	37,6	41,9	40,5	41,7	40,0	38,6	34,3	31,2	37,0	35,6	34,8		36,3	38,5	33,1	38,0	38,4	37,3	35,7	32,3	38,6	36,0	35,2
Kline280398	36,0	38,4	35,1	38,5	38,6	39,1	33,7	31,8	35,0	35,3	34,3		33,3	35,3	29,8	36,4	35,3	36,0	30,9	29,7	34,7	32,7	32,5
Klnh081294	34,0	38,4	29,4	35,2	39,4	35,0	32,5	28,3	31,9	34,9	35,3		33,1	36,3	30,9	35,4	34,7	33,9	31,8	28,9	34,5	31,7	32,4
Klre080104	38,2	39,8	36,5	41,8	40,9	41,1	35,2	32,2	37,5	39,0	37,8		35,3	37,0	31,6	37,1	36,5	37,2	32,6	32,3	37,3	35,0	36,6
Klvs280700	41,8	44,1	42,8	45,2	42,9	45,3	39,2	38,4	43,0	39,6	38,0		34,6	36,2	31,7	37,7	36,1	36,1	32,4	31,5	34,7	34,8	34,4
Klkh300705	34,6	36,3	35,7	36,6	37,1	38,0	32,0	28,5	36,1	34,0	31,2		34,4	37,2	32,2	34,3	38,0	36,3	32,6	29,4	36,3	31,8	35,7
Klin180900	39,9	40,9	38,0	42,1	41,8	44,6	38,7	34,1	41,5	38,7	38,6		34,6	35,0	32,7	34,7	37,4	37,4	32,9	30,5	34,8	34,8	36,3
Klbo081201	41,6	44,9	40,0	45,1	43,0	42,8	40,0	37,8	39,3	42,2	41,3		36,8	39,0	33,9	38,2	37,3	36,1	38,5	30,9	40,1	36,3	38,1
Klzi311009	35,1	39,3	35,1	37,5	36,6	37,0	31,6	30,3	34,2	35,5	33,7		35,8	37,4	33,6	38,8	38,1	38,0	33,3	31,1	37,6	34,2	35,5
Kina291009	36,2	37,6	36,4	39,8	38,3	38,8	34,3	30,4	34,8	34,7	37,1		37,4	39,7	33,2	39,2	39,3	38,9	36,1	32,6	39,0	37,9	37,9
Kline090197	39,0	43,0	33,0	40,5	43,7	43,1	37,5	32,0	37,3	40,2	39,4		40,6	42,7	37,4	41,9	42,8	41,0	39,3	35,7	43,4	39,1	43,1
Klan101109	37,4	39,8	38,0	40,3	40,1	38,1	33,6	32,9	37,4	37,8	36,0		41,1	44,4	35,7	44,1	42,3	43,6	38,1	36,3	40,6	42,8	42,6
Klinu201109	37,0	38,8	32,6	38,9	44,2	38,2	36,6	30,9	36,2	37,8	36,0		41,5	45,8	36,6	41,3	42,5	46,5	38,0	36,2	42,1	42,0	44,5
Klye200406	33,8	36,1	28,5	34,3	39,0	37,1	36,1	25,9	33,9	31,7	35,0		36,0	36,1	31,7	34,8	37,5	36,3	44,5	32,8	35,3	34,7	36,1
Klte210310	38,6	41,4	39,4	40,8	41,0	41,1	35,5	33,7	39,8	36,5	36,6		37,2	38,6	34,3	39,1	39,2	38,3	35,8	32,7	39,9	36,5	37,2
Klina120909	36,1	38,9	31,8	36,0	41,0	39,5	34,7	31,3	34,7	37,1	35,6		43,7	47,5	39,6	46,0	46,2	44,8	42,1	37,4	44,1	44,4	44,8
Klin3270610	39,5	40,8	39,2	41,7	43,8	43,8	36,8	32,7	39,3	38,6	38,8		40,7	44,1	35,5	43,5	42,2	43,8	38,3	35,5	40,3	40,4	43,3
Klru280204	41,9	46,4	43,1	45,2	43,8	45,2	40,5	35,4	39,2	40,4	39,8		38,5	39,3	34,1	40,8	39,5	39,8	37,4	34,0	40,8	39,5	39,9
Klino90606	38,3	41,8	40,2	41,5	38,9	41,6	36,1	32,9	36,7	38,2	35,5		37,6	38,7	33,3	40,5	40,2	40,6	35,3	35,3	37,3	36,4	37,9
Kly1x20810	42,3	46,1	43,9	42,9	45,6	44,2	39,0	36,7	43,6	40,0	40,8		35,9	38,3	32,0	34,5	38,9	38,6	35,7	31,5	38,7	34,5	36,9
Klrr010509	38,2	37,8	35,9	40,5	40,6	41,1	36,6	34,7	40,6	37,2	37,5		36,2	36,2	33,0	36,3	37,9	37,6	35,8	33,0	41,0	35,2	36,5
Klinh151209	37,4	38,3	35,7	39,7	38,8	42,2	35,0	31,7	39,6	36,9	36,2		34,5	37,7	31,0	35,5	36,2	35,0	33,9	28,8	37,5	33,8	35,4
Klhn211209	36,3	38,7	38,0	39,0	37,1	37,8	34,0	33,1	35,1	36,3	34,2		37,0	38,4	32,5	38,4	39,7	40,0	33,8	32,8	39,0	36,8	38,0
Klin160703	36,1	37,6	35,0	38,8	40,8	39,6	34,0	30,8	35,7	34,8	34,0		38,5	41,0	34,9	41,1	40,8	39,8	35,8	34,2	36,9	40,4	40,3
Klve100310	40,4	41,8	38,6	41,1	43,9	45,9	38,9	34,3	41,4	40,0	38,6		34,5	35,8	29,9	34,7	37,7	36,3	33,6	30,0	39,2	32,3	35,4
Klnc240410	36,7	40,4	37,3	40,0	38,5	39,3	34,7	32,7	35,1	35,2	34,2		39,3	41,5	36,5	41,8	40,5	40,3	36,2	35,7	39,5	39,8	41,7
Kldm150902	36,2	37,8	31,6	38,4	39,5	37,5	34,1	31,8	37,9	35,9	37,2		36,5	36,2	34,3	37,9	37,8	37,7	35,8	31,7	39,7	35,6	38,7
Klde120499	37,4	39,7	34,9	40,2	39,7	40,9	35,3	31,1	37,5	37,8	36,9		38,4	41,9	33,2	40,8	40,0	39,7	37,3	33,3	39,6	38,7	39,6
Klr210402	38,5	43,0	33,5	39,1	43,4	41,2	36,5	31,1	38,2	39,9	38,8		37,2	36,3	34,0	38,7	39,9	39,1	34,7	33,8	39,1	37,7	38,5
Klrb040497	35,0	38,1	28,7	34,7	42,9	36,2	35,9	26,7	32,7	35,2	38,9		44,2	47,8	41,7	48,1	48,2	47,6	42,4	35,1	43,2	44,0	44,1
Klmd040898	39,3	41,8	41,7	41,3	40,3	40,8	35,0	34,2	38,2	43,6	36,9		38,0	39,3	34,5	41,8	41,0	39,8	36,3	33,7	38,1	38,1	37,6
Klod300802	39,1	42,7	38,5	41,3	39,7	45,7	37,1	33,0	37,7	40,0	35,5		42,5	45,3	39,5	46,2	46,5	41,1	41,5	38,6	43,5	41,4	41,1
Kline100999	38,2	40,0	36,7	40,4	41,9	40,1	37,4	31,8	38,8	37,5	37,5		40,5	41,0	41,8	41,2	42,3	46,3	37,3	37,7	40,6	39,3	37,2
Klee120498	33,8	37,3	29,2	36,6	41,4	36,3	33,3	25,9	31,1	33,1	33,9		41,0	45,9	39,9	43,5	42,1	41,3	38,3	34,3	44,7	40,3	40,2
Klhb110597	38,0	39,1	37,7	40,5	40,5	41,3	36,5	32,1	38,4	36,4	38,0		47,0	50,4	46,6	47,0	48,7	51,4	42,9	41,5	47,6	47,0	47,0
Klmo120102	34,2	35,7	35,4	35,5	36,7	36,2	33,3	29,4	32,2	34,3	33,0		42,3	43,6	42,4	46,0	45,7	47,3	40,4	34,5	43,1	40,9	39,6
Kica020702	37,4	39,7	39,1	40,9	39,9	40,3	35,5	32,3	37,1	34,9	34,5		48,6	51,0	49,6	51,6	50,5	54,2	45,7	41,6	48,3	46,2	47,3
Kina010999	37,2	38,8	36,7	38,7	38,3	39,4	34,3	31,4	43,2	36,3	35,3		41,3	44,2	37,7	44,0	43,9	41,4	38,8	38,2	39,7	43,7	41,2
Kler040398	39,5	43,2	41,0	42,4	39,3	41,9	36,9	35,6	39,4	38,1	37,0		44,0	45,8	40,1	45,0	47,1	46,5	42,1	39,6	44,8	44,3	44,8

Kontrollen

Methylierungsergebnisse der SGA- und der Kontrollgruppe des Genortes NESP. Die erste Spalte eines Genortes zeigt den Mittelwert einer Probe (MW), jede weitere Spalte steht für einen einzelnen CpG, jede Zeile stellt eine analysierte Probe dar. Methylierungswerte in % Methylierung.

Tabelle 24: Methylierungswerte des Genortes *NESPAS* 20q13

SGA	MW	CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5		MW	CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5
Klen190400	44,0	38,9	58,5	45,8	40,6	36,3		44,6	39,8	57,8	43,6	40,4	41,4
Klci140795	45,5	47,5	56,8	42,6	39,6	41,0		50,4	46,4	60,5	51,5	49,5	44,2
Klly111097	44,0	37,9	57,4	44,9	40,4	39,2		46,3	41,2	60,1	46,7	43,0	40,4
Klmh180596	44,2	39,9	57,1	45,5	40,0	38,7		47,8	43,8	60,6	47,0	45,3	42,5
Klvi250398	44,6	39,9	54,4	44,1	42,6	42,2		48,0	43,3	60,2	47,6	46,6	42,5
Kku160492	45,0	40,8	60,1	43,6	40,1	40,6		47,4	41,0	58,1	46,8	43,9	
Kle180499	43,3	38,7	56,2	45,5	37,6	38,4		43,3	38,5	53,8	40,3	40,8	
Klck260996	50,8	46,5	63,6	51,3	48,6	43,7		51,9	41,6	71,1	58,0	50,7	38,1
Klmr231091	44,5	40,7	57,3	43,6	41,0	39,9		43,7	40,3	54,5	43,5	40,6	39,7
Kinl190493	42,6	39,6	55,9	40,4	38,5	38,4		45,6	39,5	58,2	46,1	43,6	40,8
Klnn260496	47,4	41,6	61,4	49,6	43,5	40,7		46,5	41,8	52,3	49,3	42,5	
Klra011096	41,4	35,2	54,6	42,6	39,3	35,5		45,6	39,3	60,1	47,4	42,6	38,5
Kle280398	44,9	39,6	57,1	46,0	41,9	40,0		43,7	40,6	57,4	44,0	39,9	36,7
Klh081294	45,9	40,9	59,6	45,2	43,0	40,7		45,2	38,8	57,3	46,9	43,7	39,1
Klre080104	47,9	43,3	60,4	48,4	45,2	42,3		44,5	39,3	56,7	45,2	41,0	40,1
Klvs280700	49,0	45,2	59,0	51,5	43,6	45,8		49,8	42,8	65,2	50,0	46,5	44,8
Klkh300705	45,2	41,0	57,2	46,8	41,6	39,6		41,5	35,4	55,5	42,8	38,9	35,0
Klin180900	46,0	41,2	58,0	46,7	42,0	42,0		45,1	41,4	58,3	44,7	40,4	40,9
Klbo081201	46,5	43,5	59,4	48,5	40,6	40,4		43,2	37,7	58,3	43,8	41,1	35,1
Ktzl311009	43,4	39,1	56,5	44,5	40,3	36,5		39,9	36,0	51,1	39,3	37,8	35,3
Klna291009	45,0	40,1	58,3	45,8	40,9	39,8		43,6	39,0	57,5	43,3	41,3	36,9
Kle090197	47,3	41,4	60,4	47,5	43,9	43,4		56,3	48,8	71,7	59,9	53,1	48,0
Klan101109	43,8	38,6	57,0	44,6	39,8	39,2		41,6	44,9	63,8	51,2	48,2	0,0
Klnu201109	41,3	37,5	53,6	42,4	36,5	36,5		46,6	43,8	62,4	44,4	43,1	39,2
Klye200406	44,7	40,4	53,6	43,9	44,7	40,9		46,2	42,4	61,0	46,6	45,4	35,8
Klte210310	47,0	41,2	58,9	48,5	44,0	42,3		45,4	39,2	60,2	44,7	42,3	40,6
Klna120909	44,8	39,8	61,1	43,5	39,6	40,2		53,0	46,2	72,0	51,4	49,3	46,0
Kln&270610	45,9	40,9	57,7	45,3	43,0	42,8		48,6	43,4	64,1	48,0	44,4	43,3
Klru280204	38,3	37,5	53,8	35,6	30,7	33,9		40,9	31,1	54,7	43,8	40,3	34,9
Klnl090606	45,4	40,5	58,5	45,7	41,4	40,7		48,7	44,4	63,9	48,0	45,3	41,9
Kly1x20810	44,0	37,6	60,2	44,3	39,0	38,8		45,1	38,8	58,5	45,9	42,7	39,6
Klrr010509	43,7	39,3	53,9	42,0	43,2	39,9		46,9	42,4	64,2	45,4	45,6	36,7
Klh151209	43,7	38,9	54,9	42,9	41,5	40,5		46,1	38,9	68,7	48,0	38,8	36,1
Klnn211209	44,6	41,7	54,2	47,1	41,0	39,2		37,1	36,3	48,3	40,6	34,0	26,1
Kltn160703	42,9	36,6	53,5	43,5	40,5	40,5		48,4	41,6	61,9	46,4	43,9	
Kve100310	42,3	37,4	52,0	42,4	40,7	38,9		49,4	38,0	61,7	54,1	48,6	44,7
Klnc240410	46,1	42,3	58,2	46,4	43,4	40,0		48,8	41,3	62,8	49,4	41,8	48,7
Kldm150902	45,7	41,4	59,4	46,3	41,7	39,7		44,0	38,6	56,4	41,6	39,2	
Klde120499	43,3	44,5	54,3	40,9	37,3	39,7		41,4	33,0	57,0	44,0	38,4	34,7
Klrl210402	44,3	40,8	55,9	43,8	40,5	40,4		43,8	40,2	57,5	44,3	38,4	38,7
Klrb040497	42,5	38,9	56,5	40,5	37,5	39,0		48,0	43,3	59,3	47,5	43,9	46,3
Klmd040898	45,6	41,5	60,1	46,3	41,8	38,4		43,5	38,7	53,3	42,8	41,2	41,5
Klod300802	46,7	42,0	58,2	48,4	43,1	41,9		49,9	44,1	60,1	49,9	45,1	50,3
Kle100999	44,3	38,7	55,1	43,9	41,1	42,6		43,4	38,4	54,9	42,5	41,8	39,6
Klee120498	42,7	38,4	54,3	41,3	39,8	39,7		51,3	44,4	72,7	51,1	40,9	47,4
Klbh110597	45,0	41,0	59,9	43,9	41,8	38,6		45,3	42,6	57,1	42,8	42,5	41,9
Klmo120102	41,7	36,0	52,3	42,1	39,9	38,4		55,2	46,1	71,8	57,2	50,1	50,9
Klca020702	40,5	37,7	50,7	40,2	37,0	37,1		52,5	51,3	70,8	47,0	53,1	40,3
Klna010999	44,4	39,6	60,1	45,2	40,8	36,0		52,6	49,1	60,5	51,4	52,2	49,7
Kler040398	45,3	41,7	58,2	45,7	40,8	40,1		57,7	54,5	68,1	58,5	52,8	54,7

Kontrollen

Methylierungsergebnisse der SGA- und der Kontrollgruppe des Genortes *NESPAS*. Die erste Spalte eines Genortes zeigt den Mittelwert einer Probe (MW), jede weitere Spalte steht für einen einzelnen CpG, jede Zeile stellt eine analysierte Probe dar. Methylierungswerte in % Methylierung.

8 Veröffentlichung

Bens, S., Haake, A., Richter, J., Lehold, J., Kolarova, J., Vater, I., Riepe, F. G., Buiting, K., Eggermann, T., Gillessen-Kaesbach, G., Platzer, K., Prawitt, D., Caliebe, A., Siebert, R. (2012). Frequency and characterization of DNA methylation defects in children born SGA. *Eur. J. Hum. Genet.*

9 Danksagung

Bei der Erstellung meiner Doktorarbeit haben mir viele Leute unterstützend zur Seite gestanden, Ihnen allen gilt mein herzlichster Dank.

Herrn Prof. Dr. med. Reiner Siebert danke ich vielmals für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Kiel durchführen zu können sowie für die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas, die gute Betreuung und konstruktive Kritik.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Susanne Bens, die mir während der gesamten Zeit immer unterstützend und beratend zur Seite gestanden hat, stets für alle Probleme ein offenes Ohr hatte und mich durch diese Dissertation geleitet hat. Die Zusammenarbeit hat mit viel Spaß gemacht.

Für die große Hilfsbereitschaft beim praktisch/ experimentellen Teil dieser Arbeit möchte ich mich bei allen medizinisch-technischen Assistenten und anderen Mitarbeitern des Instituts bedanken. Insbesondere danke ich Ute Jacobsen und Elke Heiden, die mich in die Labormethoden eingeleitet haben und mich jederzeit bei der technischen Durchführung unterstützt haben. Auch Andrea Haake möchte ich meinen herzlichen Dank für die großartige Hilfe beim Auswerten der Daten und der Unterstützung während des gesamten Projekts aussprechen.

Nicht zu vergessen sind meine Eltern, die mir mein Studium erst möglich gemacht haben und immer verlässlich für mich da waren. Außerdem möchte ich mich bei meinem Freund Christoph bedanken, der in jeder Hinsicht eine große Hilfe ist.

Vielen Dank!

10 Lebenslauf

Judith Leohold

Persönliche Angaben

Geburtsdatum	05. Juli 1986
Geburtsort	Hannover, Deutschland
Adresse	Schanzenstraße 11, 21614 Buxtehude, Deutschland
Familienstand	ledig, keine Kinder

Ausbildung

1993 – 2006	Freie Waldorfschule Wolfsburg, Abitur
2003 – 2004	Austauschjahr in Kearney, Nebraska, USA mit Besuch der High School
2006 – 2012	Studium Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Herbst 2008	1. Staatsexamen (Note 2,0)
08/2009-01/2010	ERASMUS-Austauschsemester an der Université de Picardie Jules Verne in Amiens, Frankreich
11/2012	2. Staatsexamen (Note 2,0), Abschluss des Studiums

Praktische Erfahrung

01-02/2008	Hiwi-Job im Institut für Anatomie, Uni Kiel
Famulatur:	03/2009; 08/2009; 03/2010; 03/2011 (insgesamt 4 Monate) Pädiatrie, Innere Medizin (Kardiologie), Humangenetik
2006-2008	Pflegepraktikum (insgesamt 3 Monate)
Praktisches Jahr:	08/2011 bis 07/2012
1. Tertial:	Innere Medizin, Klinikum Itzehoe, Deutschland
2. Tertial:	Chirurgie, Westküstenklinikum Heide, Deutschland
3. Tertial:	Pädiatrie, Uniklinikum Kiel, Deutschland

Promotion

05/2010	Beginn der Doktorarbeit im Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, CAU zu Kiel
---------	--

11 Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich meine Doktorarbeit „Assoziation von Störungen der DNA-Methylierung an Genorten, die dem Imprinting unterliegen, mit SGA-Geburtlichkeit“ selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe und dass ich alle von anderen Autoren wörtlich übernommenen Stellen, wie auch die sich an die Gedanken anderer Autoren eng anlehrenden Ausführungen meiner Arbeit, besonders gekennzeichnet und die Quellen nach den mir angegebenen Richtlinien zitiert habe.

Kiel, den 07. Mai 2013

Judith Leohold