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

**NACHWEIS VON STÖRUNGEN DER DNA-METHYLIERUNG
BEI PATIENTEN MIT
STÖRUNGEN DER GEISTIGEN ENTWICKLUNG**

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

vorgelegt von
IMKE MARIA TANGEN
aus **Ibbenbüren**

Kiel 2015

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Ole Ammerpohl

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Heiner Kramer

Tag der mündlichen Prüfung: 29.09.2016

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 25.07.2016

gez.: Prof. Dr. med. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	iv
1. Einleitung.....	1
1.1 Intelligenzstörung.....	1
1.2 Epigenetik.....	2
1.2.1 DNA-Methylierung.....	2
1.2.2 Beeinflussung der epigenetischen Regulation durch Mutationen.....	3
1.2.3 Genomische Prägung (Imprinting).....	4
1.3 Zielsetzung.....	6
2. Material und Methoden.....	7
2.1 Material.....	7
2.1.1 Untersuchungsmaterial.....	7
2.1.2 Patientengruppe: Merkmale und Einschlusskriterien.....	7
2.1.3 Kontrollgruppe: Merkmale und Einschlusskriterien.....	8
2.1.4 Materialien.....	9
2.1.4.1 Chemikalien.....	9
2.1.4.2 Kits.....	9
2.1.4.3 Geräte.....	9
2.1.4.4 Puffer und Lösungen.....	10
2.1.4.5 Kontrollmaterialien.....	11
2.1.4.6 Primer.....	11
2.1.4.7 Software und Online-Datenbanken.....	11
2.1.4.8 Microarrays.....	11
2.2 Methoden.....	12
2.2.1 DNA-Extraktionsverfahren.....	12
2.2.2 Qualitätskontrolle der DNA.....	12
2.2.3 Array-Analyse mittels Infinium <i>HumanMethylation450 BeadChip</i>	13
2.2.4 Pyrosequenzierung.....	17
2.2.5 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA).....	19
3. Ergebnisse.....	21
3.1 Qualitätsparameter.....	21
3.2 Analyse der DNA-Methylierung.....	22
3.2.1 Ergebnis der differentiellen DNA-Methylierungsanalyse.....	22
3.2.2 Untersuchung auf aberrant methylierte Signalwege.....	23

3.3 Untersuchung auf bekannte Imprintingstörungen	26
3.3.1 Liste bekannter Imprinting-Störungen	26
3.3.2 Identifizierte Imprinting-Störungen.....	27
3.3.3 Hypomethylierung in <i>MEG 3</i>	29
3.3.3.1 Fallbeschreibung des Patienten mit einer Methylierungsstörung in <i>MEG 3</i>	29
3.3.3.2 Bestätigung der Hypomethylierung in <i>MEG3</i> mittels Pyrosequenzierung	29
3.3.4 Hypermethylierung in <i>IGF2</i>	30
3.3.4.1 Fallbeschreibung des Patienten mit Hypermethylierung in <i>IGF2</i>	30
3.3.4.2 Bestätigung der Hypermethylierung in <i>IGF2</i> mittels Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)	30
3.3.5. Hypomethylierung in <i>FAM50B</i>	31
3.3.5.1 Zusätzlich identifizierte Imprintingstörung in <i>FAM50B</i>	31
3.3.5.2 Fallbeschreibung der Patientin mit Methylierungsstörung in <i>FAM50B</i>	32
3.4 Patientenbezogene Analyse der DNA-Methylierung	32
3.4.1 Flow-Chart.....	33
3.4.2 Betrachtung von Kleingruppen	34
3.4.3 Betrachtung einzelner Patienten	39
3.5. Weiterführende Analysen nach Abschluss dieser Arbeit	41
4. Diskussion.....	43
4.1 Technische Diskussion	43
4.1.1 Material.....	43
4.1.2 Methoden	45
4.1.2.1 Array-Analyse mittels Infinium <i>HumanMethylation450 BeadChip</i>	45
4.2 Diskussion der Ergebnisse	47
4.2.1 DNA-Methylierungsanalysen	47
4.2.1.3 Untersuchung auf bekannte Imprinting-Störungen	48
4.2.1.2 Patientenbezogene Analyse der DNA-Methylierung.....	51
4.3 Fazit	55
4.4 Ausblick.....	56
5. Zusammenfassung	58
6. Literaturverzeichnis.....	vi
7. Anhang	xv
7.1. Übersichtstabelle der klinischen Daten der Patientengruppe.....	xv
7.2 Übersichtstabelle der 254 differentiell methylierten CpG-Loci	xvi

7.3 Untersuchung auf bekannte Imprintingstörungen	xxii
7.3.1 Heatmap des <i>PLAGL1</i> - Locus.....	xxiii
7.3.2 Heatmap des <i>GRB10</i> -Locus	xxiv
7.3.3 Heatmap des <i>MEST</i> -Locus.....	xxiv
7.3.4 Heatmap des <i>H19</i> -Locus	xxv
7.3.5 Heatmap des <i>KCNQ1</i> -Locus	xxvi
7.3.6 Heatmap des <i>GNASAS</i> -Locus.....	xxvii
7.3.7 Heatmap des <i>SNRPN</i> -Locus.....	xxviii
7.4. Tabelle geprägter Loci	xxix
8. Danksagung	xxx
9. Lebenslauf	xxxii
10. Veröffentlichungen	xxxiii

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, Purinbase der DNA
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Array-CGH	array-comparative genomic hybridization
AS	Angelman-Syndrom
Avg. beta	Average Beta
Bp	Basenpaare
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
C	Cytosin, Pyrimidinbase der DNA
CA	California
CHR	Chromosom
cm	Centimeter
CpG	Dinukleotidsequenz aus: Cytosin-Phosphat-Guanin
DIMDI	Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information
DMR	differentiell methylierte Region
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintrichloressigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
FDR	false discovery rate
F-Primer	forward-primer (Vorwärts-Primer)
g	Gramm
G	Guanin, Purinbase der DNA
H ₂ O	Wasser
HLA	human leukocyte antigens
ICD-10-GM	Die Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision, German Modification
ICR	imprinting control region
IgG	Immunglobulin G
IQ	Intelligenz-Quotient
K	Kilo
Kb	Kilobase
L	Liter
M	Molar
mat UPD14	maternale uniparentale Disomie 14
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten
ml	Milliliter
MLPA	multiplex ligation dependent probe amplification
MR	mentale Retardierung
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSP	methylation-specific polymerase chain reaction
µg	Mikrogramm

µl	Mikroliter
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NR	Nummer
N-Shelf	North-Shelf
OR	Odds Ratio
p	kurzer Chromosomenarm (p = petit)
pat UPD14	paternale uniparentale Disomie 14
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PHP1b	Pseudohyperparathyreoidismus Typ 1b
pmol/µl	picomol pro microliter
PWS	Prader-Willi-Syndrom
q	langer Chromosomenarm
RNA	ribonucleic acid
R-Primer	reverse-Primer (Rückwärts-Primer)
RR	relatives Risiko
RSS	Russell-Silver-Syndrom
sec	Sekunden
S-Primer	Sequenzier-Primer
TBE	tris buffered saline
TNDM	transienter neonataler Diabetes mellitus
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TS	transcription site
U	Uracil
UCSC	University of California Santa Cruz
UPD	uniparentale Disomie
UTR	untranslated region
UV-Licht	Ultraviolett-Licht
V	Volt
V/cm	Volt pro Centimeter
„27k Array“	Infinium <i>HumanMethylation27k BeadChip</i>
„450k-Array“	Infinium <i>HumanMethylation450k BeadChip</i>

1. Einleitung

1.1 Intelligenzstörung

Die Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision, German Modification (ICD-10-GM), definiert die Intelligenzstörung als „Zustand von verzögerter oder unvollständiger Entwicklung der geistigen Fähigkeiten; besonders beeinträchtigt sind Fertigkeiten, die sich in der Entwicklungsperiode manifestieren und die zum Intelligenzniveau beitragen, wie Kognition, Sprache, motorische und soziale Fähigkeiten. Eine Intelligenzstörung kann allein oder zusammen mit jeder anderen psychischen oder körperlichen Störung auftreten.“ Sie wird anhand des Intelligenz-Quotienten (IQ) in vier Formen unterteilt, in leichte Intelligenzminderung (IQ von 50 bis 69), mittelgradige Intelligenzminderung (IQ von 35 bis 49), schwere Intelligenzminderung (IQ von 20 bis 34) und schwerste Intelligenzminderung (IQ unter 20) (In: <http://www.dimdi.de/static/de/klassi/icd-10gm/kodesuche/onlinefassungen/htmlgm2014/block-f70-f79.htm>; Dimdi 2013). Zum Teil zeigen sich schon im Säuglings- und Kleinkindalter erste Anzeichen, wie zum Beispiel verminderte motorische Aktivität, abnormes Spielverhalten und verzögertes Erreichen der altersspezifischen Entwicklungsstufen (Tzschach und Ropers 2007). Die Prävalenz liegt bei circa 2-3%; bei ungefähr 0,3-0,5% der Bevölkerung liegt eine Intelligenzstörung mit einem IQ von unter 50 vor (van Bokhoven 2011). In der Bundesrepublik Deutschland leben somit ungefähr 2 Millionen Menschen mit einer leichten Intelligenzstörung. Circa 400.000 Menschen sind von einer Intelligenzstörung mit einem IQ von unter 50 betroffen. Die häufigste bekannte Ursache sind numerische Chromosomenaberrationen, unter diesen ist die Trisomie 21 führend (Rauch et al. 2006). Daneben stellen strukturelle Aneusomien, Mikrodeletionssyndrome und monogene Erkrankungen eine häufige Ursache dar (Rauch 2008). Insgesamt bleiben aber bei bis zu 60% der Patienten¹ die Ursachen für eine Intelligenzstörung unklar (Rauch et al. 2006). Obwohl eine bekannte Ätiologie zumeist trotzdem keine kausale Therapie ermöglicht, hilft es Patienten und ihren Familien, die Behinderung zu akzeptieren und damit umzugehen (Rauch et al. 2006). Des Weiteren ist es für die Eltern eine emotionale Entlastung, die Ursache zu kennen (Lenhard et al. 2005). Die Kenntnis des Wiederholungsrisikos und gegebenenfalls die Möglichkeit einer gezielten pränatalen Diagnostik spielen oft eine Rolle bei weiterem Kinderwunsch (Rauch et al. 2006). Neben der Belastung für den Patienten und seine Angehörigen

¹ Der Begriff „Patienten“ meint hier „Patientinnen und Patienten“, aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird im Folgenden der Begriff „Patienten“ verwendet, dieser schließt die weibliche Form mit ein.

spielen auch die Kosten im Gesundheitssystem eine große Rolle. Die Diagnose und Therapie der Intelligenzstörung machen in Mitteleuropa circa 8% aller Kosten des Gesundheitssystems aus und sind diejenige Kategorie im ICD10, die den höchsten Gesamtkostenanteil trägt (Ropers und Hamel 2005²). Dies alles sind Gründe dafür, weiter nach neuen Diagnosemöglichkeiten und Therapieoptionen zu suchen.

1.2 Epigenetik

Epigenetik fasst reversible, erbliche Informationen zusammen, die nicht in der DNA-Sequenz selbst kodiert sind (Holliday 1987; Zaina und Lund 2012). Zellen eines Organismus enthalten primär identische DNA, dennoch differenzieren sie sich in verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichen Funktionen. Dieses wird ermöglicht durch eine unterschiedliche qualitative und quantitative Genexpression. Dementsprechend ist die Kontrolle der Genexpression entscheidend für die Differenzierung und Entwicklung einer Zelle (Gibney und Nolan 2010). Zu den Mechanismen der Epigenetik gehören die DNA-Methylierung, die Histon-Modifikation und die RNA assoziierte Unterbindung der Expression von Genen sowie das *nuclear positioning* (Egger et al. 2004; Espada und Esteller 2007). Diese Mechanismen tragen dazu bei, einem Organismus die Anpassung an seine Umwelt mittels veränderter Genexpression zu ermöglichen (Jaenisch und Bird 2003). Die fehlerhafte Funktion einer dieser Mechanismen oder des Zusammenspiels dieser kann zu unpassender Genexpression oder Inaktivierung von Genen führen, welche dann gegebenenfalls zu Krankheiten führen können (Egger et al. 2004).

1.2.1 DNA-Methylierung

Von den oben genannten Mechanismen ist die DNA-Methylierung eine der meist erforschten Modifikationen der Epigenetik in menschlichen Zellen (Bibikova et al. 2011). Unter DNA-Methylierung versteht man die kovalente Bindung einer Methylgruppe an das C5-Atom des Cytosin in der DNA, welche durch DNA-Methyltransferasen katalysiert wird (Newell-Price et al. 2000). Die Bindung von Methylgruppen an Cytosin findet man vor allem in der Dinukleotidsequenz CpG, wobei insgesamt ungefähr 50-70% aller CpG-Dinukleotide methyliert sind (Wigler 1981). Unmethylierte, GC-reiche Regionen, die eine hohe Dichte von CpG zeigen, nennt man CpG-Inseln. Man findet sie am 5' Ende von ungefähr 60% aller Gene. Der Großteil der CpG-Inseln bleibt in allen Entwicklungsstadien und in allen Gewebetypen unmethyliert (Bird 2002; Antequera und Bird 1993). Das DNA-Methylierungsmuster durchläuft in der

² Ropers bezieht sich hier auf einen Artikel von Polder et al. (1998), in dem die Kosten für den medizinischen Umgang mit Intelligenzstörungen im niederländischen Gesundheitssystem thematisiert werden.

Entwicklung verschiedene Stufen. Das DNA-Methylierungsmuster der Gamete wird im Präimplantationsstadium fast vollständig ausgelöscht. Mit der Implantation kommt es zur DNA-Methylierung des Genoms; nur die CpG-Inseln sind davon ausgenommen. Mit der Aufteilung in verschiedene Zellentitäten kommt es zu gewebespezifischer Demethylierung bestimmter Gene (Cedar und Bergman 2012). Es hat sich gezeigt, dass Promotoren aktiver Gene im Vergleich zu inaktiver DNA im Allgemeinen unmethyliert sind (Naveh-Manly und Cedar 1981). Die Methylierung der DNA wird mit verschiedenen Zellfunktionen in Verbindung gebracht. Sie ist beteiligt an der gewebespezifischen Genexpression, an der Zelldifferenzierung und an Alterungsprozessen. Ebenso ist sie für das genomische Imprinting essentiell. Auch bei der X-Chromosom-Inaktivierung sowie der Regulation der Chromatin-Struktur spielt sie eine entscheidende Rolle (Bird 2002; Bernstein et al. 2007). Eine weitere Funktion ist die Suppression intragenomischer Parasiten (Yoder et al. 1997). DNA-Methylierung ist ebenfalls unentbehrlich für das Überleben differenzierter Zellen (Jackson-Grusby et al. 2001). Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster haben nicht nur Einfluss auf die normale Entwicklung und Differenzierung, sondern nehmen auch Einfluss bei der Entstehung von Krankheiten. Gut untersucht sind zum Beispiel Veränderungen bei Krebs. Hier hat man über Analysen des DNA-Methylierungsmusters im Vergleich zu gesundem Gewebe festgestellt, dass das Tumorgewebe hypomethyliert war, während hingegen Tumor-Suppressor-Gene in ihrem Promotor eine abnorme DNA-Methylierung zeigten (Goelz et al. 1985; Jones und Laird 1999). Weitere Beispiele für Krankheiten mit verändertem DNA-Methylierungsmuster sind Schizophrenie und Multiple Sklerose (Bibikova et al. 2011).

1.2.2 Beeinflussung der epigenetischen Regulation durch Mutationen

Beim Menschen gibt es eine steigende Anzahl von Erkrankungen, die durch Mutationen in Genen ausgelöst werden, welche für eine epigenetische Regulation von Bedeutung sind. Ein Beispiel für eine solche Erkrankung ist das Rett-Syndrom (RTT, OMIM 312750). Dieses Syndrom entsteht durch eine Mutation des *MECP2*-Gens in Xq28 (Sirianni et al. 1998; Amir et al. 1999). *MECP2* ist ein Protein aus der Gruppe der Methyl-DNA bindenden Proteine, welches selektiv 5-Methyl-Cytosin in der CpG-Sequenz bindet (Lewis et al. 1992; Wade 2001). Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass *MECP2* über epigenetische Modifikationen dazu beiträgt, dass Gene reguliert werden, die für die neuronale Reifung verantwortlich sind (Bienvenu und Chelly 2006). Das Rett-Syndrom ist eine häufige (Prävalenz 1: 40.000, für

Mädchen ca 1: 20.000, Burd et al. 1991)³, fortschreitende Entwicklungsstörung des Nervensystems, die fast ausschließlich bei Mädchen auftritt. Betroffene Jungen können zwar, anders als ursprünglich angenommen, über die Geburt hinaus überleben, zeigen aber aufgrund der Tatsache, dass sie nur eine Kopie des Gens haben, einen stärker ausgeprägten Phänotyp als Mädchen mit dem gleichen genetischen Defekt (Bienvenu und Chelly 2006). Typischerweise erfolgt bis zum 6. bis 18. Lebensmonat eine normale Entwicklung, gefolgt von einem schrittweisen Verlust der Sprache und der Feinmotorik der Hände sowie der Entwicklung eines Mikrozephalus. Des Weiteren zeigen betroffene Patientinnen autistisches Verhalten, Krampfanfälle, Ataxie von Stamm und unterer Extremität und stereotype Handbewegungen. Dieser Zustand stabilisiert sich nach einer gewissen Zeit wieder, sodass die meisten Patientinnen bis ins Erwachsenenalter überleben (Hagberg et al. 1983; Amir et al. 1999).

Ein weiteres Syndrom, bei dem eine Mutation zu einer Beeinflussung der epigenetischen Regulation führt, ist das Kleefstra-Syndrom (OMIM 610253). Hier liegt eine Mutation von *EHMT1* in 9q34.3 vor (Kleefstra et al. 2006). Das Gen *EHMT1* kodiert für eine Histon-Methyltransferase. Die Methylierung von Histon H3 an Position Lysin-9 ist assoziiert mit der Unterdrückung der Transkription potenziell aktiver Gene (Kleefstra et al. 2012; Collins et al. 2008; Tachibana et al. 2005). Typische Merkmale bei betroffenen Patienten sind eine Intelligenzstörung, eine muskuläre Hypotonie und ein Mikrozephalus. Charakteristische faziale Auffälligkeiten sind unter anderem eine Synophrys, eine kleine Nase, eine Mittelgesichtshypoplasie und eine vorstehende Zunge. Ebenso finden sich wiederholt angeborene Herzfehler und Krampfanfälle (Stewart et al. 2004; Kleefstra et al. 2009).

1.2.3 Genomische Prägung (Imprinting)

Elterliche Prägung (englisch: Imprinting⁴) ist definiert als epigenetische Modifikation, welche dazu führt, dass Allele entsprechend ihres maternalen oder paternalen Ursprungs exprimiert werden (Feinberg et al. 2002). Die Festlegung des Imprintings erfolgt während der Entwicklung von der Keimzelle zum Spermium beziehungsweise Ovum und wird nach der Befruchtung aufrechterhalten (Reik und Walter 2001). Es gibt sowohl die Möglichkeit, dass diese unterschiedliche Gen-Expression in allen somatischen Zellen vorkommt, oder nur in einzelnen Geweben oder Entwicklungsstufen (Robertson 2005). Die Regulation der differentiellen Expression maternaler und paternaler Allele erfolgt durch die DNA-Methylierung (Li et al. 1993). Bisher sind über 90 geprägte Gene bekannt (In:

³ Burd et al. beschreiben hier die Prävalenz des Rett-Syndroms in North Dakota, USA

⁴ Anmerkung der Verfasserin

<http://www.geneimprint.com/site/genes-by-species>). Zunächst wurde angenommen, dass geprägte Gene vor allem das embryonale Wachstum beeinflussen (Kaneda 2011); es gibt aber inzwischen viele Hinweise dahingehend, dass sie auch für die spätere Entwicklung, den Metabolismus und auch für das Verhalten von Bedeutung sind (Smith et al. 2006; Miyoshi et al. 2006, Kaneda 2011). Neben genetischen Mutationen, die die Genfunktion beeinflussen können, gibt es somit auch die Möglichkeit, über ein gestörtes Imprinting Genfunktionen zu beeinträchtigen. Zum einen kann es dazu kommen, dass ein normalerweise inaktives Allel fälschlicherweise exprimiert wird, zum anderen kann ein eigentlich aktives Allel fälschlicherweise inaktiviert werden. Diese Vorgänge nennt man *Loss of Imprinting* (Smith et al. 2006). Bei einer Störung des Imprinting-Musters kann es zur Entstehung von Krankheiten kommen (Polychronakos und Kukuvtis 2002). Diese Störungen im Imprinting-Muster hängen meist mit einer veränderten Gendosis der geprägten Gene zusammen, wie zum Beispiel bei der uniparentalen Disomie (UPD), bei der chromosomalen Duplikation und der chromosomalen Deletion. Ein anderer Mechanismus ist ein verändertes DNA-Methylierungsmuster in *imprinting control regions* (ICRs). Dieser Defekt kann zum einen während der Gametogenese auftreten und zu einem fehlerhaften Auslöschen der vorhandenen geprägten Gene sowie zu fehlerhafter Etablierung neuer geprägter Gene führen, zum anderen kann es aber auch nach der Fertilisation zu einer fehlerhaften Aufrechterhaltung der genomischen Prägung kommen (Ishida und Moore 2012).

Insgesamt wurden bisher 8 genetische Syndrome entdeckt, die durch eine Störung der genomischen Prägung bedingt sind: „Angelman-Syndrom“ (AS, OMIM 105830) „Prader-Willi-Syndrom“ (PWS, OMIM 176270), „Beckwith-Wiedemann-Syndrom“ (BWS, OMIM 130650), „Russell-Silver-Syndrom“ (RSS, OMIM 180860), „transienter neonataler Diabetes mellitus“ (TNDM, OMIM 601410), „Pseudohypoparathyreoidismus Typ 1b“ (PHP1b, OMIM 103580) sowie das „Temple-Syndrom“ (OMIM #616222) und das „Kagami-Ogata-Syndrom“ (OMIM #608149) (Poole et al. 2010).

1.3 Zielsetzung

Die Intelligenzstörung ist eine häufige Beobachtung in der kinderärztlichen Praxis, deren Ursache bei bis zu 60% der Betroffenen ungeklärt bleibt (Rauch et al. 2006). Bisher weiß man, wie oben beschrieben, dass neben numerischen und strukturellen Chromosomenveränderungen, Mikrodeletionssyndromen und monogenen Erkrankungen (Rauch et al. 2006; Rauch 2008) auch epigenetische Mechanismen als Ursache für die Entwicklung einer Intelligenzstörung zugrunde liegen können. Ziel dieser Arbeit ist es nun, zu untersuchen, ob man durch genomweite DNA-Methylierungsanalysen bei Patienten mit Störungen der geistigen Entwicklung weitere Ursachen für Intelligenzstörungen entdecken kann und somit eine Veränderung der DNA-Methylierung als Ursache für die Störung der geistigen Entwicklung in Frage kommt.

Konkrete Ziele dieser Arbeit sind:

- Vergleich von Patienten mit einer Störung der geistigen Entwicklung mit altersgerecht entwickelten Kontrollen mit Hilfe einer genomweiten array-basierten Methylierungsanalyse der DNA anhand von Proben aus dem peripheren Blut
- Individuelle Analyse differentiell methylierter Regionen jedes einzelnen Patienten mit dem Ziel, neue Kandidatengene für eine Störung der geistigen Entwicklung zu benennen
- Untersuchung des Patientenkollektivs auf bekannte Imprinting-Syndrome mit atypischer Manifestation (vgl. Kap. 1.2.3)

2. Material und Methoden

2.1 Material

Die in diese Studie einbezogenen Patienten wurden alle im Rahmen der Routinediagnostik am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig Holstein, Campus Kiel, untersucht. Für alle Patienten liegt eine schriftliche Einverständniserklärung zum anonymisierten Gebrauch ihrer Proben für Forschungszwecke vor.

2.1.1 Untersuchungsmaterial

In allen Untersuchungen wurde peripheres EDTA-Blut der Patienten untersucht, um das DNA-Methylierungsmuster der Patienten zu analysieren. Dafür erfolgte die DNA-Extraktion mit Hilfe des *Nucleo-Spin Blood Kit* der Firma Macherey & Nagel im Institut für Humangenetik Kiel (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel). Bei einem Teil der Proben wurde die bereits extrahierte DNA dem Institut für Humangenetik der Universität Kiel zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Patientengruppe: Merkmale und Einschlusskriterien

Aus einem Kollektiv von 600 Patienten, die wegen einer Störung der geistigen Entwicklung überwiegend in den Instituten für Humangenetik in Lübeck und Kiel, Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Lübeck und Kiel, sowie der Klinik für Neuropädiatrie, Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel, vorgestellt worden waren und bei denen eine molekulare Karyotypisierung in den Jahren 2007 bis 2011 durchgeführt worden war, wurden Patienten unter folgenden Bedingungen für diese Studie ausgewählt:

- a) Vorliegen einer schriftlichen Einverständniserklärung
- b) Analyse der DNA mittels Mikroarrayanalyse (entweder *array-comparative genomic hybridisation* (Array-CGH) mit den Plattformen 105K oder 244K Agilent Array oder Affymetrix SNP 6.0) ohne Hinweis auf submikroskopische Chromosomenveränderungen
- c) zusätzliche Symptome als Hinweis auf eine mögliche, noch nicht diagnostizierte Imprintingstörung
 - Kleinwuchs (19 Patienten)
 - Epilepsie (30 Patienten)
 - EEG-Auffälligkeiten ohne beobachtete epileptische Anfälle (4 Patienten)

-
- muskuläre Hypotonie (27 Patienten)
 - Adipositas (10 Patienten).

d) Ausreichendes Probenmaterial

e) Ausreichende DNA-Qualität (siehe Qualitätskontrolle der DNA, Kapitel 2.2.2)

Aus dieser Gruppe wurde schließlich ein Patientenkollektiv mit 82 Patienten gebildet. Von den untersuchten Patienten sind 46 männlich und 36 weiblich (Altersspanne 0 bis 25 Jahre, Median 6 Jahre). Zusätzlich wurden umfassende Informationen zu den Patienten zusammengestellt, um für nachfolgende Analysen möglichst viele Parameter zu erhalten. Diese umfassen unter anderem faziale Auffälligkeiten (bei 36 Patienten beschrieben), motorische Entwicklungsverzögerungen (40 Patienten), Verhaltensauffälligkeiten (13 Patienten) und Fehlbildungen. Auch der Geburtszeitpunkt (Frühgeburtslichkeit oder Geburt zum Termin), Größe, Gewicht und Kopfumfang bei der Geburt, und die Größen- und Gewichtsentwicklung im Verlauf wurden aus den zur Verfügung stehenden Unterlagen soweit wie möglich zusammengetragen (s. Übersichtstabelle der Patientendaten, Tabelle 3 im Anhang). Durch einen technischen Fehler bei der Prozessierung auf dem Infinium *HumanMethylation450 BeadChip* fiel eine Probe aus, sodass bei der Array-Analyse letztendlich die Ergebnisse von 81 Patienten zur Verfügung standen.

2.1.3 Kontrollgruppe: Merkmale und Einschlusskriterien

Der Patientengruppe wurde eine Kontrollgruppe, die in Geschlecht und Alter mit der Patientengruppe weitestgehend übereinstimmt, gegenübergestellt. Diese besteht aus 19 Personen im Alter von 0 bis 17 Jahren bei Probeneingang (Median 3 Jahre), von denen 13 weiblich und 6 männlich sind. Die Kontrollgruppe wurde aus Patienten gebildet, die auf Mutationen in den Genen *Faktor 2* oder *Faktor 5*, *ALPL*, *LCT*, *GJB32* und *CFTR* untersucht worden waren, sowie Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen. Ein Teil der Proben konnte durch eine Kooperation mit dem Institut für Humangenetik der polnischen Akademie der Wissenschaften in Poznan, Polen, in die Studie einbezogen werden. Einschlusskriterium in dieser Gruppe war, dass keine Intelligenzstörung vorliegen durfte.

Eine zweite unabhängige Kontrollgruppe aus einem Projekt zu DNA-Methylierungsstörungen bei Männern mit Infertilität des Instituts für Humangenetik Kiel (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) wurde bei der patientenbezogenen Analyse der DNA-Methylierung hinzugezogen. Diese Kontrollgruppe besteht aus 10 erwachsenen Männern (Altersspanne 31 bis 44 Jahre, Median 38 Jahre).

2.1.4 Materialien

2.1.4.1 Chemikalien

- Agarose (Biozym, Oldendorf, Deutschland)
- Borsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Bromphenolblau (Serva, Heidelberg, Deutschland)
- EDTA (0,5M) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Restriktionsendonukleasen HhaI (Promega, Madison, WI, USA)
- NaOH (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Streptavidin coated Sepharose Beads (GE Healthcare, Uppsala, Schweden)
- TriDye 100bp DNA Ladder (New England BioLabs Inc., Frankfurt am Main, Deutschland)
- Tris-EDTA Buffer (100x) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

2.1.4.2 Kits

- EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, Freiburg, Deutschland)
- Infinium *HumanMethylation450 BeadChip* Kit (Illumina, San Diego, USA)
- NucleoSpin 96 Blood Kit (Macherey & Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland)
- PyroMark Gold Q96 Reagents (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- PyroMark PCR-Kit mit PyroMark PCR-Puffer, CoralLoad (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- SALSA MLPA Kit ME030-C1, Cy5-markiert (MRC-Holland, Amsterdam, Niederlande)

2.1.4.3 Geräte

- Feinwaage MC1 Laboratory LC620P (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
- Geldokumentationssystem Bio DOC Analyzer (Biometra, Göttingen, Deutschland)
- Gelkammer 41-2026 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
- Heizplatte mit Aufsatz für 96 Well Platte (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)

-
- iScan (Illumina, San Diego, CA, USA)
 - Kapillargelektrophoresesystem CEQ-8000 (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland)
 - Mikrowelle M500 (Philipps, Hamburg, Deutschland)
 - NanoDrop ND-1000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
 - PCR-Platte (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
 - PCR-Thermocycler T3000 (Biometra, Göttingen, Deutschland)
 - Pipettierhilfe Accu-Jet (Brand, Wertheim, Deutschland)
 - Plattenschüttler MS3 basic (IKA, Staufen, Deutschland)
 - PyroMark ID (Qiagen, Hilden, Deutschland)
 - PyroMark Q96 Vacuum Prep Workstation (Qiagen, Hilden, Deutschland)
 - Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
 - Vortexer:
 - REAX2000 (Heidolph, Schwabach, Deutschland)
 - Vortex Genie 2 (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz)
 - Wasserbad (Labortechnik Köttermann, Hänigsen, Deutschland)
 - Zentrifugen:
 - Biofuge primoR (Heraeus, Buckinghamshire, Großbritannien)
 - Megafuge 1.OR (Heraeus, Buckinghamshire, Großbritannien)
 - PicoFuge (Stratagene, Cedar Creek, Texas, USA)
 - Speedvac RC1010 (Jouan Abbott, Waukegan, IL, USA)
 - Universal 16 (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)

2.1.4.4 Puffer und Lösungen

- Annealing Buffer (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Bindingbuffer (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Gel-Loading-Puffer (Ladepuffer):
0,125g Bromphenolblau und 28,7g Glycerol wurden mit 100ml destilliertem H₂O aufgefüllt
- TBE-Puffer 10fach, vor Verwendung 1:10 verdünnt (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Tris-Waschpuffer (6,5g auf 5L H₂O) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

2.1.4.5 Kontrollmaterialien

- CpGenome universell methylierte DNA (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland)
- Pool-DNA (DNA von 10 weiblichen und 10 männlichen Probanden)

2.1.4.6 Primer

- F-Primer (Vorwärtsprimer): 5´ Biotin-GTGGTAGGTTTTTGGGAAGGTTTTTGGTTGGT-3´, Schmelztemperatur 66°C (rechnerisch)
- R-Primer (Rückwärtsprimer): 5´-CTTCCCCCCCCAAACATCAACATCAC-3´, Schmelztemperatur 63°C (rechnerisch)
- S-Primer (Sequenzierprimer): 5´-AACCACTAAAAATCAACTA-3´, Schmelztemperatur 36°C (rechnerisch)

2.1.4.7 Software und Online-Datenbanken

- BioDoc Analyse Software 2.1 (Biometra, Göttingen, Deutschland)
- Excel 2010 (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland)
- GOrilla: <http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/> (GeneOntology Analyse)
- GenomeStudio Software (Illumina, San Diego, USA)
- GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)
- Human Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>)
- Illumina Custom (Illumina, San Diego, USA)
- NanoDrop Software, Version 3.2.1 (peqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland)
- OMICS Explorer (Qlucore AB, Lund, Schweden)
- PyroMark Assay Design 2.0 (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Pyro Q-CpG Software 1.0.9
- Word 2010 (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland)

2.1.4.8 Microarrays

- Infinium *HumanMethylation450 BeadChip* Array® (Illumina, San Diego, CA, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Extraktionsverfahren

Die DNA-Extraktion erfolgte bei einem Großteil des Kollektivs (57 Patienten und 14 Kontrollen) mit Hilfe des *Nucleo Spin Blood Kit* der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland). Bei diesem Verfahren erfolgt zunächst eine Lyse der Zellen. Dann wird die Probe auf eine Nucleo-Spin-Säule pipettiert. Es kommt zu einer DNA-Bindung an eine sogenannte Silica-Membran. Dort wird die DNA in den nächsten Arbeitsschritten gewaschen und getrocknet. Schließlich wird das Eluat in ein anderes Röhrchen überführt und die DNA-Konzentration kann mittels des NanoDrop ND-1000 (siehe unten) gemessen werden. Die Extraktion erfolgte im Institut für Humangenetik (Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel) nach Standardmethoden entsprechend den Vorgaben des Herstellers. Die übrigen Proben wurden dem Institut für Humangenetik in Kiel bereits als extrahierte DNA-Proben für weitergehende Diagnostik zugeschickt.

2.2.2 Qualitätskontrolle der DNA

NanoDrop ND-1000:

Die Konzentrationsbestimmung sowie die Überprüfung der Reinheit der vorliegenden Nukleinsäurelösungen erfolgte mittels des NanoDrop ND-1000 (peqLab Biotechnologie, Erlangen). Dieses Gerät funktioniert als Spektrophotometer, welches die Konzentration von Lösungen anhand der optischen Dichte misst. Zur Bestimmung der Konzentration wurde die optische Dichte der DNA bei 260nm gegen die Referenzlösung destilliertes H₂O gemessen, wobei jeweils 2µl der in Wasser gelösten DNA aufgetragen wurden. Zur Überprüfung der Reinheit wurde zusätzlich das Verhältnis der Adsorptionswerte bei 260nm und 280nm ermittelt (Zielwert A₂₆₀/A₂₈₀ bei 1,8-2,0).

Agarosegel-Elektrophorese:

Um DNA-Fragmentierung nachzuweisen, wurde eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Hierbei wird die DNA entsprechend ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit in einem Agarosegel aufgetrennt und mit Fragmenten bekannter Größe (Marker) verglichen. Für die nachfolgende Array-Untersuchung mittels des Infinium *HumanMethylation450 BeadChip* wurde unfragmentierte DNA benötigt. Die *Bead Chip*-Technologie setzt eine minimale DNA-

Länge von 1kb voraus, um die DNA zu amplifizieren (Thirlwell et al. 2010). Aus diesem Grund diente die Agarosegel-Elektrophorese der Qualitätskontrolle.

Die Vorbereitung der Agarosegel-Elektrophorese begann mit dem Einbringen der Gelträger in die Gelträgerhalterung sowie dem Einsatz der Probenkämme. Zur Herstellung eines 0,8% igen Gels wurden 1,6g Agarose in einem Becherglas mit TBE-Puffer auf 200ml aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde dann in der Mikrowelle auf maximaler Stufe erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war, danach wurde H₂O hinzugefügt. Im Anschluss wurden 10µl Ethidiumbromid hinzugegeben und das Ganze wurde dann in die vorgefertigte Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren des Gels konnten die Probenkämme herausgezogen werden, sodass Geltaschen entstanden. Dann wurde die Gelkammer in die mit TBE-Gebrauchslösung gefüllte Elektrophoresekammer gestellt, wobei das Gel vollständig von dem TBE bedeckt war. Nun wurden jeweils 200ng DNA in 3,5µl Wasser mit 3,5µl Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Zum Längenvergleich wurde in eine der äußeren Geltaschen ein Längenstandard hinzugegeben. Neben dem Längenstandard erfolgte die Auftragung der DNA-Ladepuffergemische Probe für Probe in die Geltaschen. Es wurde eine konstante elektrische Spannung von 5 V/cm angelegt. Nach ungefähr 2 Stunden wurde der Gelträger mit dem Gel herausgenommen und die DNA mittels UV-Licht sichtbar gemacht, fotografiert und dokumentiert (Geldokumentationssystem BioDoc Analyzer, Biometra). Es wurden ausschließlich Proben mit unfragmentierter DNA in die Array-Analyse des Infinium *HumanMethylation450 BeadChip* eingeschlossen.

2.2.3 Array-Analyse mittels Infinium *HumanMethylation450 BeadChip*

Um eine genomweite DNA-Methylierungsanalyse durchzuführen, wurde der Infinium *HumanMethylation450 BeadChip* der Firma Illumina (San Diego, USA) benutzt. Mit Hilfe dieses Chips ist es möglich, parallel mehr als 480.000 CpG-Loci aus regulatorischen und kodierenden Regionen humaner Gene zu analysieren.

Funktionsprinzip des Infinium *HumanMethylation450 BeadChip*:

Um eine Array-basierte Untersuchung auf DNA-Methylierung durchzuführen, wird zunächst eine Bisulfit-Konversion durchgeführt (Abbildung 1), um einen Methylierungsunterschied in einen Sequenzunterschied zu konvertieren. Dabei wird zuerst doppelsträngige DNA in Einzelstränge denaturiert. Durch die Hinzugabe von Natrium-Bisulfit wird erreicht, dass bei den gewählten Reaktionsbedingungen unmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt wird. Methyliertes Cytosin hingegen wird durch Bisulfit nicht verändert (Zilberman und Henikoff,

2007). So ist es möglich, auf Ebene der DNA-Sequenz zwischen methylierten und unmethylierten CpG-Loci zu unterscheiden.

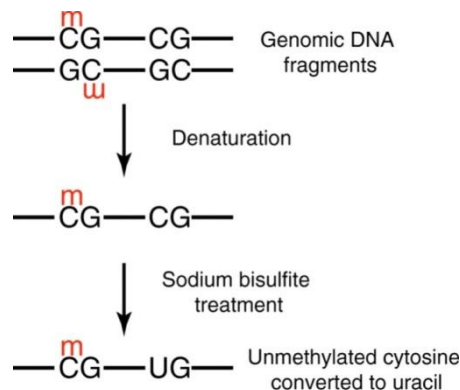


Abbildung 1: Prinzip der Bisulfit-Konvertierung.

Zunächst wird die doppelsträngige DNA denaturiert, sodass nur noch Einzelstränge vorliegen. Dann wird Natrium-Bisulfit hinzugegeben, wodurch bei den gewählten Reaktionsbedingungen unmethyliertes Cytosin (C) zu Uracil (U) umgewandelt wird, während methyliertes Cytosin (C^m) Cytosin bleibt (C^m) (modifiziert nach Zilberman D, Henikoff S 2007).

Das Funktionsprinzip des Infinium *HumanMethylation450 BeadChip* teilt sich auf zwei Funktionsprinzipien auf, den Infinium I Assay und den Infinium II Assay. Auf dem Infinium I Assay wird die Differenzierung zwischen unmethyliertem CpG-Locus und methyliertem CpG-Locus durch den Gebrauch zweier unterschiedlicher sogenannter *Beads* möglich (Abbildung 2), ein *Bead* für den methylierten Locus, ein *Bead* für den unmethylierten Locus. Wenn ein CpG methyliert vorliegt, bleibt es nach der Bisulfit-Behandlung unkonvertiert. Im Gegensatz dazu wird ein unmethyliertes CpG durch die Bisulfit-Behandlung umgewandelt in ein TpG. Der *Bead* für den unmethylierten Locus kann nur komplementär an das TpG binden. Wenn diese Bindung erfolgt ist, verlängert eine Polymerase das Oligonukleotid um ein weiteres Nukleotid, welches fluoreszenzmarkiert ist. Der *Bead* für den methylierten Locus ist nicht in der Lage, komplementär an ein TpG zu binden, sondern bindet nur komplementär an ein CpG, was wiederum dazu führt, dass eine Polymerase ein weiteres Nukleotid anbauen kann, welches andersfarbig fluoreszenzmarkiert ist; bei dem Infinium I Assay erfolgt die Differenzierung zwischen methyliert und unmethyliert also durch den Gebrauch zweier unterschiedlicher *Beads*. Anders ist dies bei dem Infinium II Assay, dessen Prinzip nur auf dem Gebrauch eines *Beads* beruht, welcher die DNA-Sequenz vorgibt. Die DNA bindet unabhängig von methyliertem oder unmethyliertem Zustand an den *Bead*. Die letzte, fragliche Position hybridisiert nicht. Dann wird komplementär entweder ein Adenin (= unmethylierter Locus) oder ein Guanin (= methylierter Locus) eingebaut, welche wiederum unterschiedlich fluorochrommarkiert sind (Abbildung 3). Hier wird also durch den Gebrauch eines Farbcodes zwischen me-

thylierten und unmethylierten CpG-Loci differenziert
(In: http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_hm450_data_analysis_optimization.pdf; Bibikova et al. 2011).

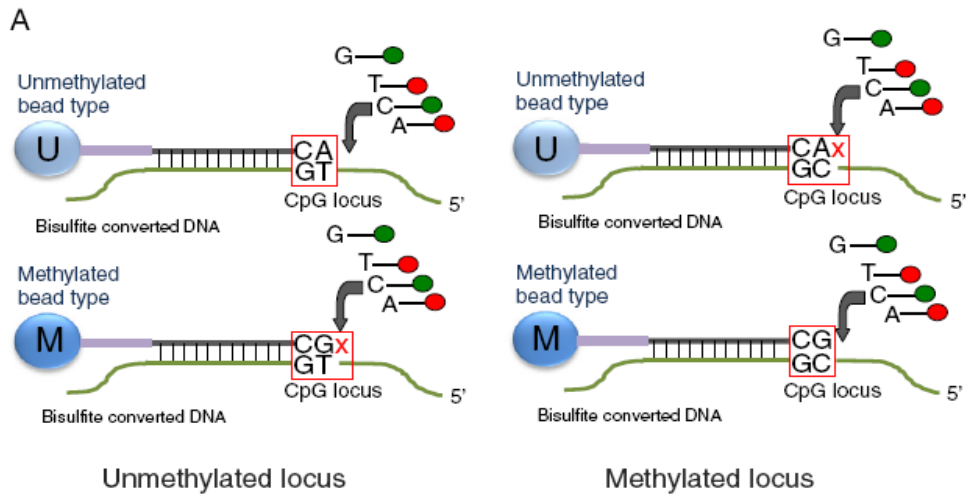


Abbildung 2: Funktionsprinzip des Infinium I Assay.

Der Infinium I Assay gebraucht zwei unterschiedliche *Bead*-Typen (blaue Kreise), pro CpG-Locus (rote Kästchen) jeweils einen für den methylierten und einen für den unmethylierten Zustand (U= *Bead* für den unmethylierten CpG-Locus, M= *Bead* für den methylierten Locus). Linke Seite oben: der *Bead* für den unmethylierten Locus (U) kann an den unmethylierten CpG-Locus binden und für eine Kettenverlängerung sorgen. Der *Bead* für den methylierten Locus (M, links unten) kann hier nicht binden und es kommt nicht zur Kettenverlängerung (rotes Kreuz). Auf der rechten Seite entsprechend andersherum: Der *Bead* für den methylierten Locus (M, unten) kann eine Kettenverlängerung bewirken, der *Bead* für den unmethylierten Locus (U) nicht (rotes Kreuz) (Bibikova et al. 2011).

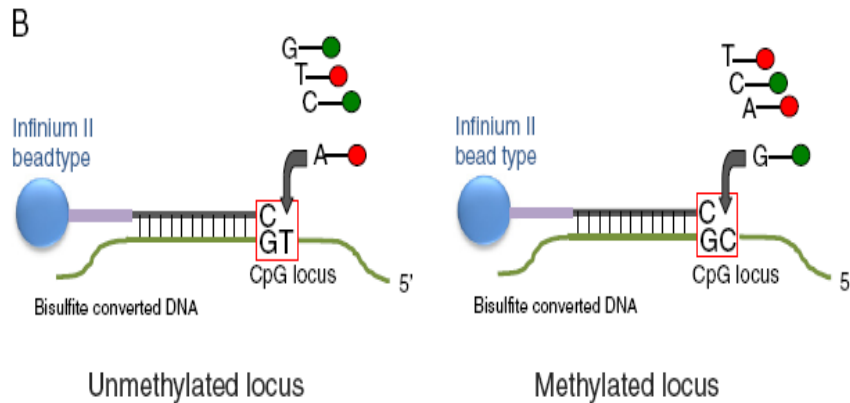


Abbildung 3: Funktionsprinzip des Infinium II Assay.

Der Infinium II Assay benutzt nur einen *Bead*-Typ (blauer Kreis). Dieser erkennt den jeweiligen CpG-Locus (rote Kästchen) als methyliert oder unmethyliert und baut eine passende, farbmarkierte Base ein. Auf der linken Seite wird ein Adenin (A) mit roter Farbmarkierung entsprechend dem unmethylierten CpG-Locus eingebaut. Auf der rechten Seite wird ein grün-farbmarkiertes Guanin entsprechend dem methylierten CpG-Locus eingebaut (Bibikova et al. 2011).

Durchführung der Array-basierten Methylierungsuntersuchung:

Die Durchführung des Versuchs erfolgte gemäß den Anleitungen des Illumina Infinium HD Methylation Assay, Manual Protocol (Illumina Proprietary 2010). Zu Beginn wurde eine Bisulfit-Konversion mit 1,0µg DNA pro Patient durchgeführt (Abb. 1). In der Array-Analyse wurden pro Patient 500ng der konvertierten DNA eingesetzt. Es erfolgten eine Denaturierung und Neutralisierung, um die Proben für die nachfolgende Amplifikation vorzubereiten. Diese wurde isotherm über Nacht durchgeführt, wodurch die Menge an DNA vervielfacht wurde. Nun wurden die amplifizierten Proben durch kontrollierte enzymatische Prozesse fragmentiert. Es folgte eine Präzipitation durch Isopropanol und anschließend eine Zentrifugation, um die fragmentierte DNA bei 4°C zu sammeln. Die präzipitierte DNA wurde in einem Hybridisierungs-Puffer resuspendiert. Im nächsten Schritt wurde die fragmentierte und resuspendierte DNA auf *BeadChips* gegeben und dann im Illumina Hybridization Oven inkubiert, um die Proben auf den *BeadChips* zu hybridisieren. Auf jeden *BeadChip*-Träger wurden jeweils 12 Proben aufgetragen, sodass insgesamt 9 Träger benötigt wurden. DNA, die nicht hybridisiert oder unspezifisch hybridisiert war, wurde herausgewaschen, und die *BeadChips* wurden nun für das Färben und Verlängern vorbereitet. Die Einzelbasenverlängerung der Oligonukleotide auf den *BeadChips* mit fluoreszenzmarkierten Basen erfolgte komplementär zu der gebundenen DNA. Durch diese Fluoreszenzmarkierung wird der DNA-Methylierungsstatus bestimmt (Abbildungen 2 und 3). Diese Markierung wurde anschließend durch einen Scanner detek-

tiert, wobei der Methylierungsstatus jedes CpG mit Hilfe des GenomeStudio Methylation module (Illumina, San Diego, USA) durch einen β -Wert ausgedrückt wird (siehe unten).

Bioinformatische Auswertung :

Der DNA-Methylierungsstatus wird durch einen β -Wert ausgedrückt, welcher zwischen 0 (unmethyliert) und 1 (methyliert) liegt (Sandoval et al. 2011). Dieser Beta-Wert errechnet sich nach der Formel: Intensität des methylierten Allels (M)/ (Intensität des unmethylierten Allels (U) + Intensität des methylierten Allels (M) + 100) (Bibikova et al. 2011). Man erhält schließlich für jeden Locus einen *average β -Wert* (avg.beta), welcher sich durch die durchschnittlichen M- (Intensität des methylierten Allels) und U- (Intensität des unmethylierten Allels) Werte nach ungefähr 30 Wiederholungen ergibt (Kuan et al. 2010). Der detection p-value, welcher die Wahrscheinlichkeit anzeigt, ab wann ein Signal unterscheidbar von einer negativen Kontrolle ist (Kuan et al. 2010), wird als $p < 0.01$ definiert.

Um eine differentielle DNA-Methylierung zwischen Patientengruppe und Kontrollgruppe zu untersuchen, wurde eine T-Test Statistik mittels des Qlucore OMICS explorer (version 3.0, Qlucore, Lund, Schweden) angewendet. Als aberrant methyliert definiert wurden CpG-Loci mit einer False Discovery Rate (FDR) kleiner als 0,01 und einer minimalen absoluten Differenz der Mittelwerte zwischen Patienten mit Intelligenzstörung und Kontrollen von 10% (*average beta* (avg.beta) größer als 0,1).

2.2.4 Pyrosequenzierung

Zum Nachweis der mittels Array-Analyse diagnostizierten DNA-Methylierungsstörung in der differentiell methylierten Region (DMR) von *MEG3* wurde eine Pyrosequenzierung nach Standardarbeitsanweisung des Instituts für Humangenetik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, zur quantitativen Bestimmung der spezifischen Basenabfolge nach Durchführung einer assayspezifischen Polymerasekettenreaktion durchgeführt.

Hierfür wurden zunächst mittels Zielsequenz-spezifischen Primern die bisulfitkonvertierten DNA-Proben amplifiziert. Folgende Primersequenzen wurden dazu benutzt:

F-Primer: 5´Biotin-GTGGTAGGTTTTTGGGAAGTTTTTTGGTTGGT-3´

R-Primer: 5´-CTTCCCCCCCAAACATCAACATCAC-3´

S-Primer: 5´-AACCACTAAAAATCAACTA-3´

Sequence to Analyse: -ACRTACCTCTATACRCCTCCACAACACCCRAAACCACRACRC
AAAAACCRACCCCRACCTCTACRACCACTCCR-
CAATAAATCCRAAAAAT-

Es wurde ein Mastermix aus den folgenden Komponenten zusammengestellt: 8µl destilliertes H₂O, 12,5µl PyroMark PCR Puffer, 2,5µl Coral Load, 0,5µl F-Primer und 0,5µl R-Primer. Zu den insgesamt 24µl Mastermix wurde jeweils 1µl bisulfitbehandelte DNA gegeben. Nun wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) durchgeführt. Pro PCR-Ansatz wurden eine normal methylierte Kontrolle (Pool aus 10 weiblichen und 10 männlichen Proben aus peripherem Blut) und eine universell methylierte Kontrolle (kommerziell erhältlich) sowie eine Negativkontrolle (destilliertes H₂O) mitgeführt. Alle Proben wurden nun in den Thermocycler gestellt und durchliefen folgendes Programm: 15 min bei 95°C, danach 45 Zyklen à 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 60°C und 30 sec bei 72°C, - dann 10 min bei 72°C und schließlich bei 4°C. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft, wobei hier ein 2%iges Agarosegel benutzt wurde und jeweils 5µl des PCR-Produkts direkt auf das Gel aufgetragen wurden. Im nächsten Schritt erfolgte die Pyrosequenzierung. Zu Beginn erfolgte die Aufreinigung der PCR-Produkte mittels der VacuumPrep Workstation. Dafür wurden die PCR-Produkte in eine 96er Platte überführt und, falls notwendig, auf 40µl mit destilliertem H₂O aufgefüllt. Pro Vertiefung (well) wurden 5µl Streptavidin Sepharose Beads und 40µl Bindungspuffer zu den PCR-Produkten pipettiert. Dann wurde die Platte abgedichtet und ungefähr 10 min auf dem Plattenschüttler geschüttelt. Nun wurde die Sequenzierplatte (PSQ) vorbereitet, indem ein Mastermix aus 40µl Annealing Buffer und 0,5µl des Sequenzierprimers (20pmol/µl) hergestellt wurde. Im Anschluss wurden die Wannen in die VacuumPrep Workstation eingesetzt und befüllt, außerdem wurde ein Vakuum an die Workstation angelegt. Für die Aufreinigung wurden die PCR-Produkte mittels des sogenannten Prep Tool aufgenommen und in 70%igem Ethanol in Wanne 1 gewaschen, danach in Wanne 2 mittels 0,2 M NaOH denaturiert und in Wanne 3 mit Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurde das PrepTool in die Halterung der PSQ-Platte eingeführt und die immobilisierten PCR-Produkte in die PSQ-Platte überführt. Als nächstes erfolgte die Hybridisierung des Sequenzierungs-Primers bei ungefähr 85°C für circa 2 min, das Annealing erfolgte beim Abkühlen auf Raumtemperatur. Die fertige Analyseplatte wurde schließlich in den PyroMark ID eingesetzt und die Auswertung mittels der applikationsspezifischen Software durchgeführt. Diese Software errechnet aus den Peakhöhen den prozentualen Anteil der DNA-Methylierung an den einzelnen CpG-Positionen.

2.2.5 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

Es wurde eine MLPA durchgeführt, um eine epigenetische Veränderung in der Chromosomenregion 11p15 nachzuweisen. Diese Region umfasst zwei gegensätzlich methylierte Imprinting-Center, welche unter anderem die Gene *IGF2*, *H19* und *KCNQ1* regulieren. Eine Dysregulation der geprägten Gene dieser Region kann zum Beckwith-Wiedemann- oder Russell-Silver-Syndrom führen (Scott et al. 2008; Weksberg et al. 2003). Das Kit für die MLPA umfasst 42 verschiedene Proben, die in einer Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion Amplifikate zwischen 129 bp und 463 bp generieren, sowie 4 zusätzliche Proben, die zur Überprüfung einer ausreichenden DNA-Menge und -Qualität dienen, 3 Proben zur Kontrolle einer erfolgreichen Denaturierung, ein X-Fragment und ein Y-Fragment. Die 42 Proben setzen sich zusammen aus 26 Proben für die 11p15 Region (diese lassen alle einen Rückschluss auf die Kopienzahl zu) und 14 Referenzproben für verschiedene Regionen außerhalb von 11p15. 11 der 26 Proben für die 11p15 Region haben eine HhaI-Schnittstelle (HhaI= methylierungssensitives Restriktionsenzym) und können so Aufschluss über den DNA-Methylierungsstatus geben. Es gibt 2 Proben für die *NSDI* Region in 5q35.2q35.3, welche mit dem Sotos-Syndrom assoziiert ist und sich mit einem ähnlichen Phänotyp präsentieren kann. Von den 14 Referenzproben besitzt eine Probe ebenfalls eine HhaI-Schnittstelle, die in normalen Kontrollen unmethyliert ist. Diese Probe amplifiziert kein PCR-Produkt nach HhaI-Verdau und dient damit der Kontrolle des Restriktionsverdau. Die Analyse setzt sich aus zwei Teilen zusammen. Der erste Teil besteht aus der Bestimmung der Kopienzahl durch die Analyse von unverdauten Proben (Copy Number Test), der zweite Teil bestimmt das DNA-Methylierungsmuster durch die Analyse der mit dem methylierungssensitiven Restriktionsenzym HhaI verdauten Proben (Methylierungstest). Die Durchführung der MLPA erfolgte gemäß der Standardarbeitsanweisung des Instituts für Humangenetik Kiel für die Diagnostik des Beckwith-Wiedemann- und Russell-Silver-Syndroms. Die im Folgenden genannten Puffer sind Teil des SALSA MLPA Kit ME030-C1 (MRC-Holland, Amsterdam, Niederlande). Die Zusammensetzung wird dem Anwender nicht mitgeteilt. Als erster Schritt wurde eine Denaturierung durchgeführt. Die DNA wurde mit Aqua dest. auf 50-100ng verdünnt. Dann wurden jeweils 5µl der verdünnten DNA in Röhrchen gegeben, kurz zentrifugiert, dann im Thermocycler 10 min bei 98°C denaturiert und wieder abgekühlt auf 25°C. Es wurden nun zu jeder Probe 1,5µl SALSA Probemix und 1,5µl MLPA Puffer hinzugegeben. Dieses wurde 1 min bei 95°C und anschließend 16 Stunden bei 60°C im Thermocycler inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Ligationsreaktion und der Verdau. Hierfür wurden 3µl Ligase-65-Puffer A

und 10µl Aqua dest. zu jeder Probe gegeben und vermischt, jeweils 10µl pro Probe wurden in ein zweites Röhrchen pipettiert. Beide Röhrchen wurden 1 min bei 48°C im Thermocycler inkubiert und dann bei 49°C darin belassen. Das erste Röhrchen wurde für den Copy-Number-Test verwendet. Dazu wurden 10µl Ligase-65 Mix (bestehend aus 1,5µl Ligase-65 Puffer B, 8,25µl Aqua dest. und 0,25µl Ligase-65) hinzugefüllt. Das zweite Röhrchen wurde für den Methylierungs-Test verwendet. Es wurden 10µl Ligase-Verdau-Mix hinzu pipettiert (bestehend aus 1,5µl Ligase-65 Puffer B, 7,75µl Aqua dest., 0,25µl Ligase-65 und 0,5µl HhaI Enzym). Es folgte nun eine Inkubation für 30 min bei 48°C, dann 5 min bei 98°C und schließlich eine Pause bei 15°C im Thermocycler. Der abschließende Schritt war eine PCR-Reaktion. Hierfür wurden 5µl Polymerase-Mix (bestehend aus 1µl SALSA PCR-Primer, 3,75µl Aqua dest. und 0,25µl SALSA Polymerase) in jedes Röhrchen pipettiert. Das PCR-Reaktionsprogramm begann dann bei 72°C, gefolgt von 35 Zyklen à 30 sec bei 95°C, 30 sec bei 60°C und 60 sec bei 72°C. Es folgten 20 min bei 72°C und eine Pause bei 15°C. Nach der PCR wurden je 10µl des Ansatzes in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und mittels des Kapillarsequenzier-System CEQ8000 (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland) analysiert.

3. Ergebnisse

Ziel des Projektes war es, genomweite DNA-Methylierungsanalysen bei Patienten mit Intelligenzstörungen durchzuführen, um nach Auffälligkeiten im DNA-Methylierungsmuster zu suchen und Kandidatengene zu identifizieren, die für den Phänotyp von Patienten mit Intelligenzstörungen ursächlich sein könnten, sowie der Frage nachzugehen, ob möglicherweise eine atypische Klinik bekannter Imprinting-Störungen vorliegt. Im Folgenden werden die Ergebnisse des Projektes vorgestellt.

3.1 Qualitätsparameter

Um die Richtigkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurden verschiedene Qualitätsparameter geprüft.

Gene-Call-Rate:

Die Gene-Call-Rate gibt bei einem p-value von 0,01 an, wie viele der 485.577 CpG-Loci einen detection p-value von $< 0,01$ zeigen. Die Mindestwerte lagen bei 99,910%. Die Analyse auf dem Infinium *HumanMethylation450 BeadChip* hat dementsprechend sehr zuverlässig funktioniert.

Vergleich mit Infinium *HumanMethylation27 BeadChip*:

Um die erzielten Ergebnisse zu verifizieren, wurde ein Vergleich zu dem Vorgängermodell des Infinium *HumanMethylation450 BeadChip* („450k Array“), dem Infinium *HumanMethylation27 BeadChip* („27k Array“), aufgestellt, welcher bereits mit den Verfahren *Methylation-specific polymerase chain reaction* (MSP), Bisulfit-Pyrosequenzierung und Bisulfit-Sequenzierung validiert ist (Martín-Subero et al. 2009a, 2009b). 90% der CpG-Loci, die mit dem 27k Array analysiert werden, werden auch von dem 450k Array erfasst. Es erfolgte ein Vergleich der Ergebnisse der DNA-Methylierungsanalysen dieser Loci aus peripheren Blutproben. In Abbildung 4 sind für 25.006 CpG-Loci die Mittelwerte der DNA-Methylierungswerte von 20 Kontrollen auf dem 27k Array gegenüber den Mittelwerten von 19 Kontrollen auf dem 450k Array als Scatterplot dargestellt. Die Ergebnisse von CpG-Loci auf dem X- und Y-Chromosom wurden nicht miteinbezogen, damit geschlechtsspezifische Effekte keinen Einfluss auf das Ergebnis haben. Die dort dargestellte Varianz lässt sich dadurch erklären, dass nicht dasselbe Kontrollkollektiv analysiert wurde. Es ergab sich trotz der Analyse zweier unterschiedlicher Kontrollkollektive ein Pearson-Korrelationskoeffizient

von 0,982, womit eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der beiden Array-Analysen angenommen werden kann.

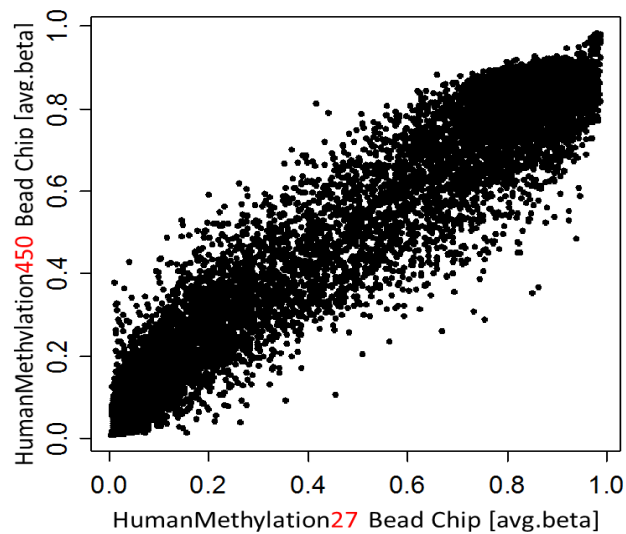


Abbildung 4: Scatterplot der DNA-Methylierungswerte von 25.006 CpG Loci, die auf beiden Arrays (27K versus 450K) abgebildet sind.

Dargestellt sind pro Locus die Mittelwerte der DNA-Methylierungswerte von 20 Kontrollen auf dem 27kArray gegenüber den Mittelwerten von 19 Kontrollen auf dem 450kArray, wobei sich die Kontrollkollektive nicht entsprechen.

3.2 Analyse der DNA-Methylierung

3.2.1 Ergebnis der differentiellen DNA-Methylierungsanalyse

Zunächst wurden alle analysierten CpG-Loci auf differentielle DNA-Methylierung zwischen Patienten und Kontrollen untersucht. Als „aberrant methyliert“ definiert wurden CpG-Loci mit einer False Discovery Rate (FDR) kleiner als 0,01 und einer minimalen absoluten Differenz der Mittelwerte zwischen Patienten mit Intelligenzstörung und Kontrollen von 10% (average beta (avg.beta) größer als 0,1). Die Berechnung der differentiell methylierten Loci wurde mittels des „*Illumina Custom*“-Model (Illumina, San Diego, USA) durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte anhand der internen Kontrollen auf dem Array. Eine Hintergrundkorrektur wurde nicht durchgeführt. Auch hier wurden die Ergebnisse der CpG-Loci auf dem X- und Y-Chromosom nicht in die Analyse einbezogen, um geschlechtsspezifische Effekte auszuschließen. Es erfolgte eine supervidierte hierarchische Clusteranalyse (Abbildung 5).

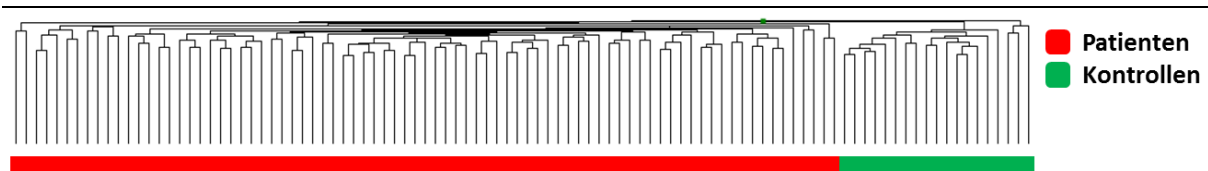


Abbildung 5: Hierarchische Clusteranalyse zur Differenzierung von Patienten mit Intelligenzstörung und Kontrollen (FDR<0,01, delta.beta>0,1).

Die oben genannten Kriterien werden von 254 Loci erfüllt (siehe Übersichtstabelle der 254 differentiell methylierten CpG-Loci im Anhang, Tabelle 4). Anhand dieser 254 Loci ist es möglich, auf Ebene der DNA-Methylierungswerte zwischen der Patientengruppe und dem Kontrollkollektiv zu unterscheiden.

3.2.2 Untersuchung auf aberrant methylierte Signalwege

In einem nächsten Schritt wurde eine Gene-Ontology-Analyse durchgeführt. Hiermit ist es möglich herauszufinden, ob Gene einzelner Signalwege überdurchschnittlich häufig aberrant methyliert sind. Dafür wurden alle Gene, die nach den oben genannten Bedingungen als aberrant methyliert definiert wurden, mit allen Genen verglichen, die auf dem Array untersucht wurden. Dies erfolgte mit der Online Software GOrilla (In: <http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>). In Abbildung 6 ist das Ergebnis des GOrilla-Process dargestellt. Es fallen vor allem der Interferon-vermittelte Signalweg sowie die Signalwege der Antigen-Prozessierung und -Präsentation auf. Diese drei Signalwege vermitteln wichtige Informationen des Immunsystems. Interferon Gamma ist ein Zytokin, zu dessen Aufgaben die Aktivierung von Makrophagen, der Immunglobulin-Klassenwechsel zum IgG sowie die Verstärkung der MHC-Klasse-II Expression gehört. Es wird vor allem von T-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen und Makrophagen produziert (Schütt und Bröker 2009a).

Der Signalweg der Antigen-Präsentation ist wichtig zur Erkennung von Antigenen. Antigene werden den T-Lymphozyten mittels antigenpräsentierender Zellen präsentiert (Schütt und Bröker 2009b). Bevor diese Präsentation erfolgt, müssen die Antigene zu kurzen Peptiden prozessiert werden. Diese werden den T-Lymphozyten dann zusammen mit speziellen, zelleigenen Oberflächenmolekülen präsentiert. Diese sind alle am Haupt-Histokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) auf Chromosom 6 kodiert (Schütt und Bröker 2009c).

Bisher konnte kein Literaturhinweis gefunden werden, der einen ursächlichen Zusammenhang zwischen dem Phänotyp der Intelligenzstörung und einer aberranten DNA-Methylierung der genannten Signalwege aufweist.

In der Gene-Ontology-Analyse fielen neben den drei genannten Signalwegen die *HLA*-Gene ebenfalls gehäuft als differentiell methyliert auf, welches bei genauerer Betrachtung auf eine mögliche Verbindung zum Phänotyp der Störung der geistigen Entwicklung hinweist: Neben den oben genannten Funktionen des MHC und der *HLA*-Gene hat sich hier in den letzten Jahren ein Hinweis auf eine zusätzliche Funktion dieser außerhalb des Immunsystems gezeigt, nämlich in der Entwicklung und der Plastizität des Nervensystems (Corvin und Morris 2014; Elmer und McAllister. 2012). Dieses ist aber noch nicht lange bekannt und noch nicht abschließend erforscht (Elmer und McAllister 2012).

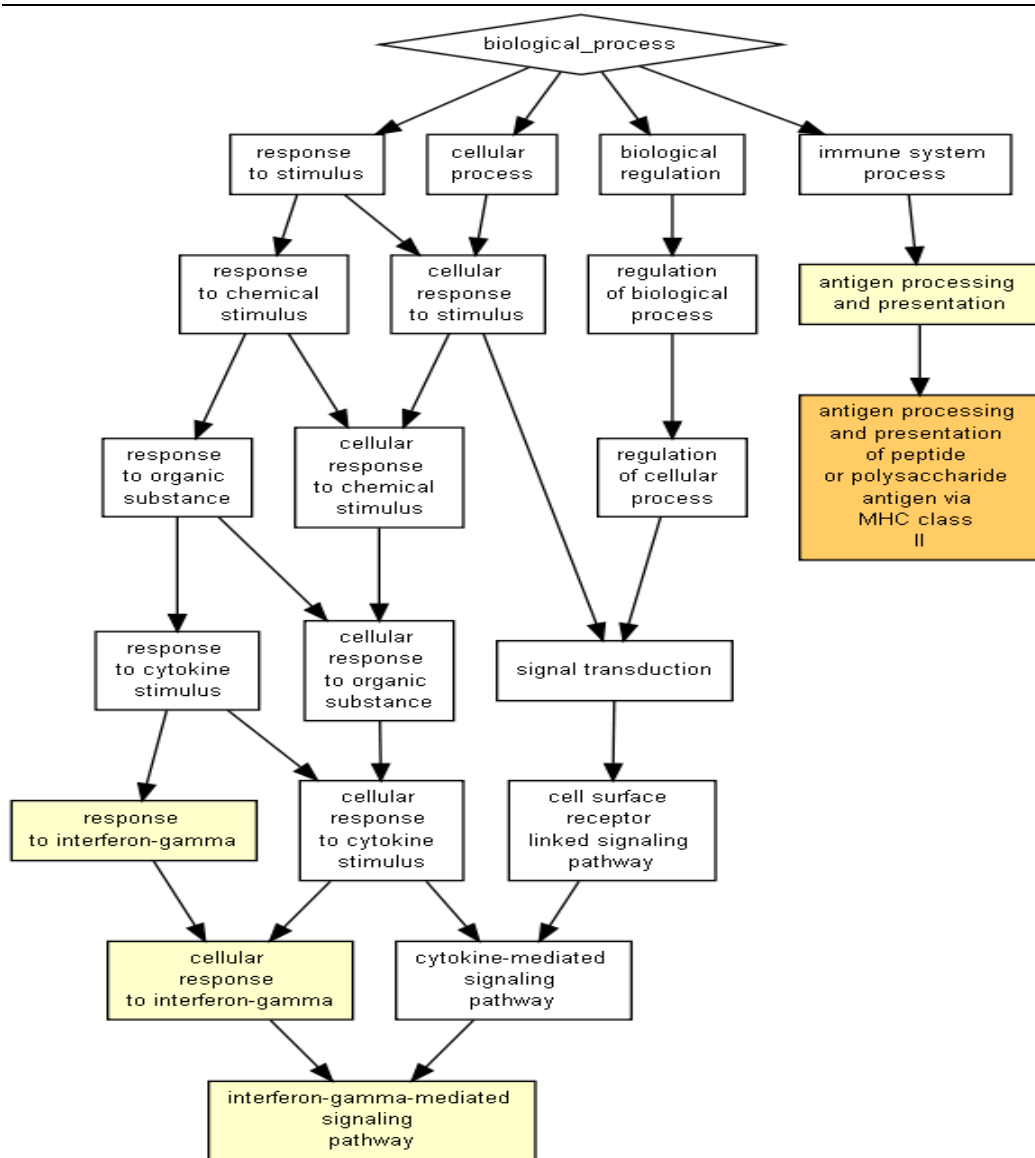


Abbildung 6: GeneOntology-Analyse mittels GOrilla. Die einzelnen Felder des „Stammbaums“ sind in der Farbe des entsprechenden P-Wertes aus der Bildunterschrift markiert, entsprechend der Häufigkeit des Vorkommens der einzelnen Signalwege (□ : $P > 10^{-3}$, □ : $P = 10^{-3}$ bis 10^{-5} , □ : $P = 10^{-5}$ bis 10^{-7} , □ : $P = 10^{-7}$ bis 10^{-9} , ■ : $P < 10^{-9}$). Abgebildet ist der GOrilla-Process. Es wurden alle aberrant methylierten Gene mit allen auf dem Array analysierten Genen verglichen. Die Gene der Antigen-Präsentation, -Präsentation und des Interferon-vermittelten Signalwegs kommen überdurchschnittlich häufig vor.

3.3 Untersuchung auf bekannte Imprintingstörungen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, in der Patientengruppe nach Imprinting-Störungen zu suchen, welche sich mit atypischer Klinik präsentieren. Um die Chance dafür zu erhöhen, waren die Einschlusskriterien Kleinwuchs, Epilepsie, EEG-Auffälligkeiten ohne beobachtete epileptische Anfälle, muskuläre Hypotonie und Adipositas aufgestellt worden, da diese Symptome wiederkehrend bei Patienten mit Imprinting-Störungen beobachtet werden. Es wurde eine Untersuchung auf bekannte Imprinting-Syndrome durchgeführt. Diese Analyse orientiert sich an einer Arbeit von Poole et al. aus dem Jahr 2010, bei der in einer Gruppe von 90 Patienten bei zwei Patienten ein Imprinting-Syndrom diagnostiziert sowie bei 4 Patienten eine Methylierungsauffälligkeit in *IGF2R* festgestellt werden konnte. Deshalb wurde in dieser Studie in Anlehnung an Poole et al. (2010) und Mackay et al. (2008) eine Untersuchung auf DNA-Methylierungsstörungen in *PLAGL1*, *GRB10*, *MEST*, *H19*, *KCNQ1OT1/KCNQ1*, *IGF2*, *MEG3*, *SNRPN* und *GNAS* durchgeführt, da Methylierungsstörungen dieser Loci mit bekannten Imprintingstörungen einhergehen.

3.3.1 Liste bekannter Imprinting-Störungen

Locus	Chromosomale Region
<i>PLAGL1</i>	6q24.2
<i>GRB10</i>	7p12.2
<i>MEST</i>	7q32.2
<i>H19</i>	11p15.5
<i>KCNQ1OT1/KCNQ1</i>	11p15.5
<i>IGF2</i>	11p15.5
<i>MEG3</i>	14q32
<i>SNRPN</i>	15q11.2
<i>GNAS</i>	20q13.2

Tabelle 1: Tabelle der Loci, die mit Imprinting-Störungen mit bekanntem klinischem Phänotyp einhergehen. Modifiziert nach Poole et al. (2010) und Mackay et al. (2008).

3.3.2 Identifizierte Imprinting-Störungen

Es wurden alle in Tabelle 1 aufgelisteten Loci bei jedem Patienten analysiert. Dabei wurden alle auf dem Array untersuchten CpG-Loci nach den in Tabelle 1 genannten Loci gefiltert und als Heatmap dargestellt. Es ergaben sich zwei Abweichungen im DNA-Methylierungsmuster, eine Hypomethylierung in *MEG3* (Abbildung 7) und eine Hypermethylierung in *IGF2* (Abbildung 8). Sowohl die Hypomethylierung in *MEG3* als auch die Hypermethylierung in *IGF2* liegen in der DMR (differenziell methylierter Region) des jeweils betroffenen Gens (Court et al. 2014).

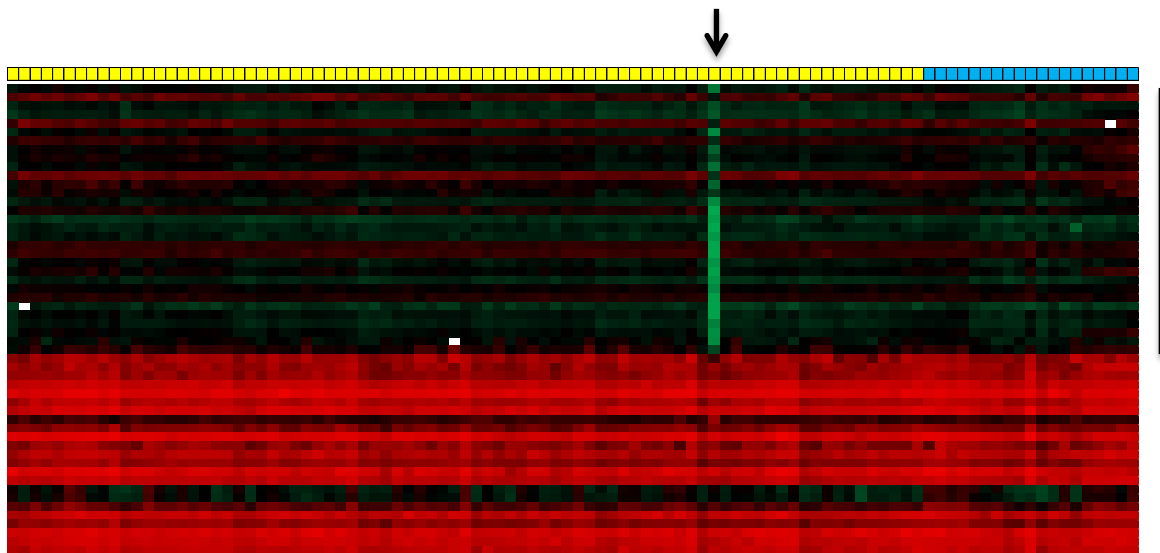


Abbildung 7: Darstellung der Heatmap des *MEG3* Locus mit einer Hypomethylierung einer Patientenprobe in *MEG3*.

- Patienten 1 bis 82 (von links nach rechts)
- Kontrollen 1 bis 19 (von links nach rechts)
- Zeilen: nach der Mapinfo sortierte, auf dem Array analysierte CpG-Loci von *MEG3*
- ➔ Patient mit Methylierungsstörung in *MEG3*
- ➔ DNA-Methylierung von 0%-Methylierung (grün) bis 100%-Methylierung (rot)
- Aberrant methylierter Bereich

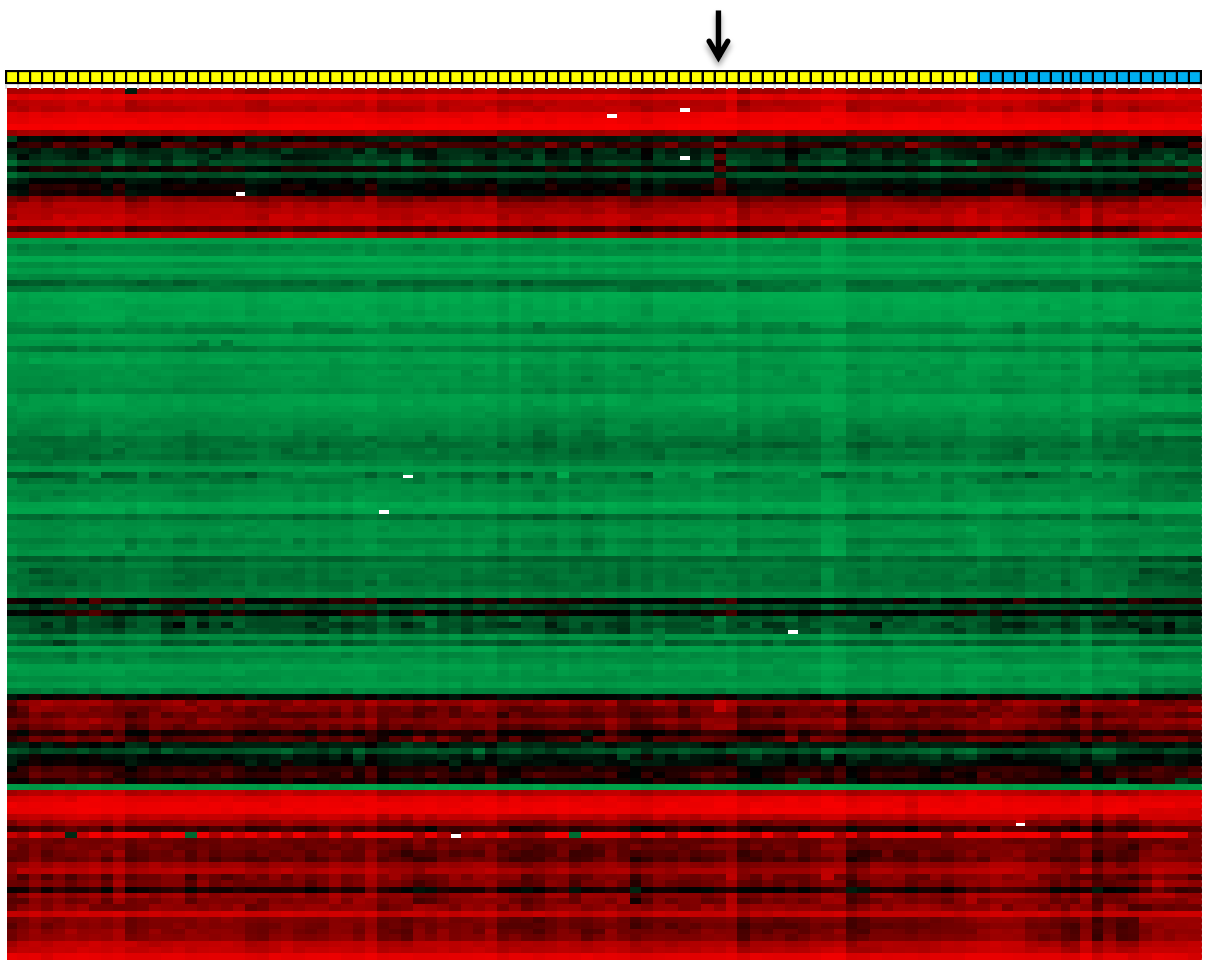


Abbildung 8: Darstellung der Heatmap des *IGF2* Locus mit einer Hypermethylierung einer Patientenprobe in *IGF2*.

■ Patienten 1 bis 82 (von links nach rechts)

■ Kontrollen 1 bis 19 (von links nach rechts)

Zeilen: nach der Mapinfo sortierte, auf dem Array analysierte CpG-Loci von *IGF2*

→ Patient mit Methylierungsstörung in *IGF2*

→ DNA-Methylierung von 0%-Methylierung (grün) bis 100%-Methylierung (rot)

— Aberrant methylierter Bereich

Die Darstellung der Analysen aller anderen bekannten Imprinting-Störungen findet sich im Anhang (Abbildungen 17-23).

3.3.3 Hypomethylierung in *MEG3*

3.3.3.1 Fallbeschreibung des Patienten mit einer Methylierungsstörung in *MEG3*

Der Patient mit einer Hypomethylierung in *MEG3* ist männlich und war bei Probeneinsendung drei Jahre alt. Es wurde eine humangenetische Untersuchung durchgeführt, weil bei ihm eine Entwicklungsverzögerung aufgefallen war. Als weitere Symptome sind ein Kleinwuchs, ein Kryptorchismus und eine hohe Stirn beschrieben. Die fazialen Merkmale wurden als ähnlich dem Russell-Silver-Syndrom beschrieben. Eine Mikrodeletion in der Chromosomenregion 14q32 ist durch die Array-CGH Untersuchung zuvor weitestgehend ausgeschlossen worden. Da es in diesem Projekt aufgrund der Anonymisierung der Proben nicht möglich ist, die Herkunft (maternal oder paternal) der Allele mittels Mikrosatelliten-Analysen zu untersuchen, kann nicht geklärt werden, ob eine uniparentale Disomie oder eine Epimutation als Ursache der Methylierungsstörung in *MEG3* vorliegt.

3.3.3.2 Bestätigung der Hypomethylierung in *MEG3* mittels Pyrosequenzierung

Um das Ergebnis der Hypomethylierung in *MEG3* zu bestätigen, wurde ein zweites Untersuchungsverfahren gewählt, die Pyrosequenzierung. Auch hier zeigte sich eine deutliche Hypomethylierung von *MEG3* (Abbildung 9). Bei der Array-Analyse und der Pyrosequenzierung wurden allerdings nicht dieselben CpG-Loci analysiert. Nur zwei CpG-Loci von *MEG3* in der Array-Analyse liegen in unmittelbarer Nähe des untersuchten Bereichs der Pyrosequenzierung. Die mittlere DNA-Methylierung in der Pyrosequenzierung liegt bei 12,155%, Spannweite 4,85% bis 31,01% [Mapinfo 101293787-101293869, Build GRCh37/hg19]. Die mittlere DNA-Methylierung der in dieser Region liegenden, auf dem Array analysierten CpG liegt bei 10,01% [Mapinfos 101293726 und 101293856, Build GRCh37/hg19]). Damit bestätigt die Pyrosequenzierung das Ergebnis der Array-Analyse.

Assay name	MEG3 seq 2										mean methylation
CpG-Nr.	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	
Sample ID	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
MR64	4,85	16,9	14,65	7,65	6,5	12,06	9,3	6,7	31,01	11,93	12,155
Meth. K.	94,6	82,26	92,96	86,86	90,07	83,93	92,38	95,97	93,98	93,81	90,682
pool (p.B.)	39,01	44,27	47,54	40,04	38,39	38,7	42,39	41,52	62,56	47,29	44,171

Abbildung 9: Pyrosequenzierung zur Bestätigung der Hypomethylierung in *MEG3*. Patient 64 (MR64) zeigt in allen analysierten CpG-Loci von *MEG3* (CpG 11-20) eine deutliche Hypomethylierung (mean methylation 12,155) im Vergleich zur methylierten Kontrolle (mean methylation 90,682) und dem Pool (bestehend aus zehn weiblichen und zehn männlichen Probanden) (mean methylation 44,171).

3.3.4 Hypermethylierung in *IGF2*

3.3.4.1 Fallbeschreibung des Patienten mit Hypermethylierung in *IGF2*

Der Patient mit einer Hypermethylierung in *IGF2* ist ein Junge, der bei Probeneinsendung ein Jahr alt war. Er zeigte bei der Untersuchung einen hypotonen Muskeltonus und dystrophe Extremitäten, seine Haut wurde als grün-gelblich beschrieben. Bei der Beobachtung seines Verhaltens fiel schrilles Schreien auf. Auffällig waren tiefsitzende Ohren, eine Sattelnase und eine Balkenstirn. Es fielen weiterhin eine prämatüre Synostose der Sutura squamosa mit rechts prominentem Os temporale, eine Kraniotabes, eine einseitige Nierenagenesie, eine Hypospadie, eine 4-Fingerfurche rechts, eine Nageldystrophie, Syndaktylien von Zeige- und Ringfinger beidseitig sowie eine Brachymesophalangie vom kleinen Finger beidseitig auf. Seine Hoden lagen im Leistenkanal. Er hatte eine dezente Hypokalzämie. Seine Rippen waren wirbelsäulennah kolbenförmig aufgetrieben. Klinisch bestand bei dem Jungen ursprünglich der Verdacht auf ein Cat-Eye-Syndrom, welches mit der Array-CGH Analyse ausgeschlossen werden konnte. Auch hier kann der Entstehungsmechanismus der Imprinting-Störung nicht abschließend geklärt werden (siehe oben).

3.3.4.2 Bestätigung der Hypermethylierung in *IGF2* mittels Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

Zur Diagnostik der 11p15 Region wird im Institut für Humangenetik (Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel) die Methode Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) verwendet. Mit diesem Verfahren ist es möglich, die Kopienzahl und das DNA-Methylierungsmuster der fraglichen Region zu analysieren (Scott et al. 2008). Das Ergebnis der MLPA zeigte weder Kopienzahlveränderungen noch Methylierungsauffälligkeiten in den analysierten CpG-Loci. Daraufhin wurden die zu analysierenden CpG-Loci verglichen und es fiel auf, dass die MLPA nicht dieselben CpG-Loci von *IGF2* analysiert, die der Infinium *HumanMethylation450 BeadChip* untersucht (Abbildung 10).

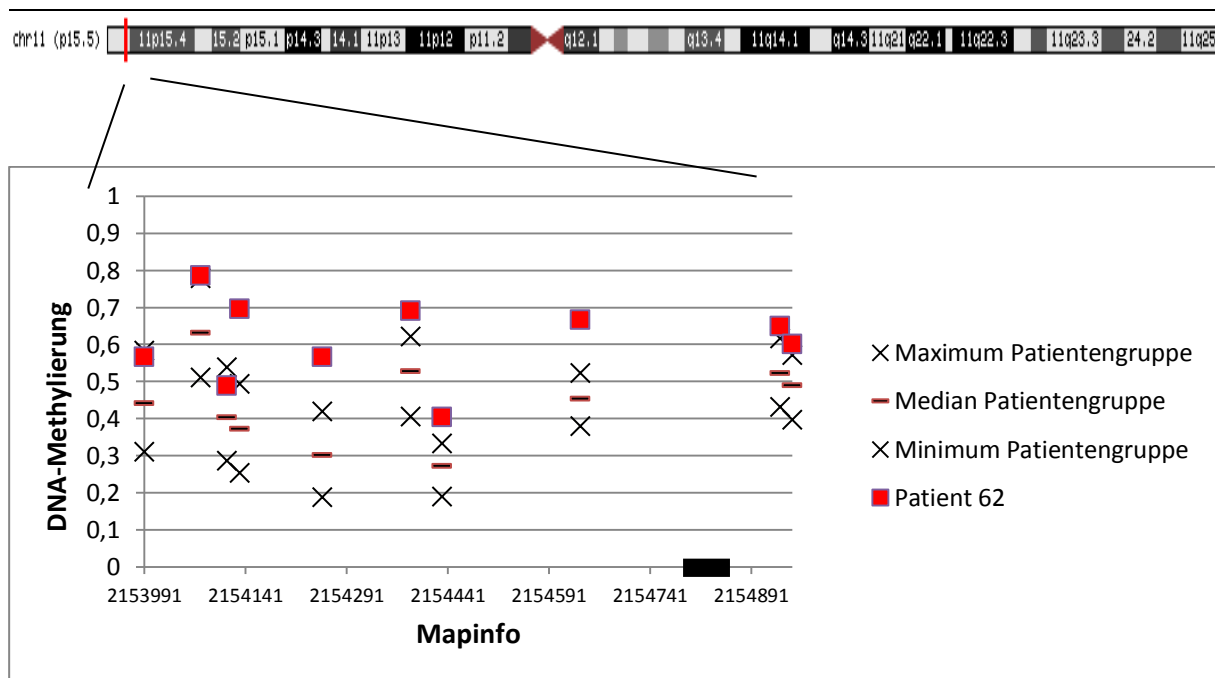


Abbildung 10: Punktdiagramm der DMR von *IGF2*. Darstellung der Hypermethylierung des Patienten 62 im Vergleich zu Maximum, Median und Minimum der Patientengruppe.

DNA-Methylierung: DNA-Methylierungsstatus von 0 bis 1 (0=0% Methylierung, 1=100% Methylierung).

Map info: gibt die jeweilige Position des CpG-Locus auf Chromosom 11 an (Build GRCh37/hg19).

■ Bereich der in der MLPA analysierten Mapinfos von *IGF2* (Mapinfo 2154820-2154871, Build GRCh37/hg19).

Der Bereich der aberranten DNA-Methylierung, welche bei diesem Patienten gefunden wurde, liegt außerhalb der von der MLPA analysierten Region, deshalb kann die MLPA nicht zur Validierung genutzt werden und die Hypermethylierung in *IGF2* bleibt ohne Bestätigung durch ein zweites Verfahren.

3.3.5. Hypomethylierung in *FAM50B*

3.3.5.1 Zusätzlich identifizierte Imprintingstörung in *FAM50B*

In zwei aktuellen Studien von Nakabayashi et al. aus dem Jahr 2011 und von Court et al. aus dem Jahr 2014 wurden neue geprägte Gene identifiziert. In unserer Studie wurden daraufhin diese Loci (Tabelle 5 im Anhang) bei jedem Patienten analysiert. Dabei wurden wiederum alle auf dem Array untersuchten CpG-Loci nach den in Tabelle 5 genannten Loci gefiltert und als Heatmap dargestellt. Es ergab sich erneut eine Abweichung im DNA-Methylierungsmuster, denn es zeigte sich eine Hypomethylierung in der DMR von *FAM50B* bei einer Patientin (Abbildung 11).

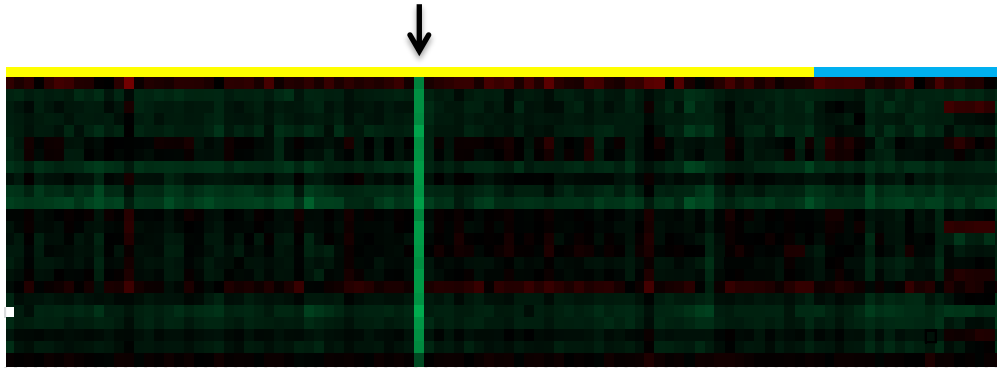


Abbildung 11: Darstellung der Heatmap der DMR des *FAM50B* Locus mit einer Hypomethylierung.

■ Patienten 1 bis 82 (von links nach rechts)

■ Kontrollen 1 bis 19 (von links nach rechts)

Zeilen: nach der Mapinfo sortierte CpG-Loci der DMR von *FAM50B*

→ Patientin mit Methylierungsstörung in *FAM50B*

→ DNA-Methylierung von 0%-Methylierung (grün) bis 100%-Methylierung (rot)

3.3.5.2 Fallbeschreibung der Patientin mit Methylierungsstörung in *FAM50B*

Die Patientin mit der Hypomethylierung in *FAM50B* war bei Probeneingang 25 Jahre alt. Es sind bei ihr sowohl eine Störung der geistigen als auch der motorischen Entwicklung beschrieben. Bei der Geburt in der 40. Schwangerschaftswoche war sie 55cm groß (99. Perzentile) und das Geburtsgewicht lag bei 4230g (91. bis 98. Perzentile). Der Kopfumfang betrug 37cm (98. Perzentile). Im Alter von 25 Jahren war die Patientin 137cm groß, welches deutlich unter der 5. Perzentile liegt und der Kopfumfang lag mit 53cm auf der 10. Perzentile. Die Patientin hatte einen verzögerten Pubertätsbeginn mit einer Menarche im Alter von 19 Jahren. Es sind anamnestisch Krampfanfälle sowie eine beidseitige Hyperopie beschrieben.

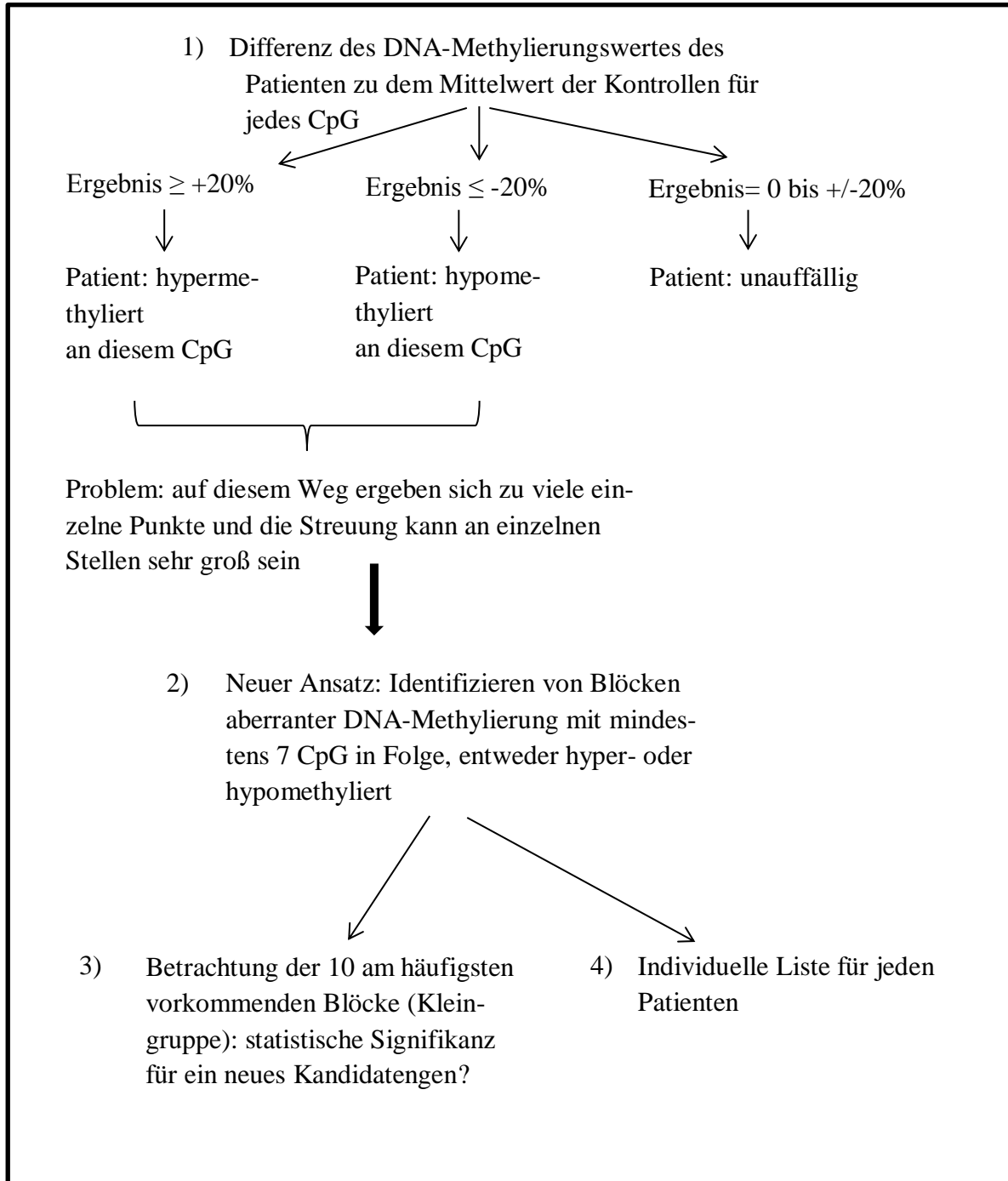
Die Hypomethylierung in der DMR von *FAM50B* bleibt zunächst ohne Bestätigung durch ein zweites Verfahren, da der zu einer Bestätigung benötigte Pyrosequenzierungsassay bei Abschluss dieser Arbeit noch nicht entwickelt war.

3.4 Patientenbezogene Analyse der DNA-Methylierung

Bei der Untersuchung auf bekannte Imprinting-Störungen wurden bei drei Patienten DNA-Methylierungsauffälligkeiten in CpG-Loci gefunden, die in der globalen DNA-Methylierungsanalyse unentdeckt geblieben waren. Dieses liegt darin begründet, dass im ersten Teil der DNA-Methylierungsanalysen dieser Studie die Berechnung zwischen gesamter Patienten- und gesamter Kontrollgruppe erfolgte. Um in einem nächsten Schritt nach individuellen DNA-Methylierungsaberrationen zu suchen, wurde der Methylierungswert jedes CpG-Locus jedes einzelnen Patienten mit dem Mittelwert der Kontrollen verglichen.

3.4.1 Flow-Chart

Der Ablauf der patientenbezogenen Analyse wird zur besseren Übersicht in einem Flow-Chart dargestellt:



3.4.2 Betrachtung von Kleingruppen

Auf der Suche nach DNA-Methylierungsstörungen, die spezifisch für Intelligenzstörungen sind, wurden CpG-Loci gesucht, die folgende Bedingungen erfüllen: Es müssen 7 CpG-Loci in Folge entweder verstärkt oder vermindert methyliert um mindestens 20% gegenüber dem Mittelwert der Kontrollen vorliegen. Dafür wurde ein sogenanntes `Sliding-Window` über alle analysierten CpG-Loci gelegt und nach Bereichen gesucht, in denen 7 CpG in Folge entweder hyper- oder hypomethyliert sind gegenüber dem Mittelwert der Kontrollen. Ein `Sliding-Window` startet an jeder chronologisch sortierten Mapinfo eines Chromosoms neu, so kann keine Position übersehen werden. Tabelle zwei zeigt die zehn am häufigsten vorkommenden aberrant methylierten Blöcke im Patientenkollektiv. Am häufigsten aberrant methyliert zeigte sich eine Lokalisation auf Chromosom 1 (Tabelle 2, Nummer 1), bei der 37 Patienten und 8 Kontrollen einen aberrant methylierten Block aufweisen; jeweils 18 Patienten und 4 Kontrollen zeigen eine über 7 CpG-Loci reichende Hypermethylierung um mindestens 20% im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollen und jeweils 19 Patienten und 4 Kontrollen weisen hier eine Hypomethylierung auf. Aufgrund der Tatsache, dass prozentual nahezu gleich viele Patienten und Kontrollen von der aberranten DNA-Methylierung an dieser Stelle betroffen sind, wird diese Region als nicht spezifisch für eine Intelligenzstörung eingestuft. Gleiches gilt für die beiden aufgezeigten Lokalisationen auf Chromosom 5 (Tabelle 2, Nummern 3 und 4), für die drei Lokalisationen von Chromosom 6 (Tabelle 2, Nummern 5, 6 und 7) und für Chromosom 22 (Tabelle 2, Nummer 10).

Dem gegenüber stehen drei Lokalisationen, bei denen eine aberrante DNA-Methylierung entweder nur in der Patientengruppe auftritt, oder aber die aberrante DNA-Methylierung der Patienten- und Kontrollgruppe entgegengesetzt ist. Dieses betrifft Chromosom 7 (Tabelle 2, Nummer 8), Chromosom 2 (Tabelle 2, Nummer 2), und Chromosom 17 (Tabelle 2, Nummer 9).

Nummer	Chromosom	Mapinfo	Gen	Patienten- Anzahl	Patienten		Kontrollen- Anzahl	Kontrollen	
					1	-1		1	-1
1	1	205818956	<i>PM20D1</i>	37	18	19	8	4	4
2	2	113992762	<i>PAX8</i>	10	7	3	1	0	1
3	5	135415948	-	16	0	16	2	0	2
4	5	180377617	<i>BTNL8</i>	10	0	10	1	0	1
5	6	291687	<i>DUSP22</i>	16	0	16	1	0	1
6	6	29648345	-	6	0	6	2	0	2
7	6	30039403	<i>RNF39</i>	10	10	0	3	3	0
8	7	27183375	<i>HOXA5</i>	9	9	0	0	0	0
9	17	7832764	<i>KCNAB3</i>	15	7	8	1	0	1
10	22	24384245	<i>GSTT1</i>	9	9	0	1	1	0

Tabelle 2: Auflistung der 10 Positionen, die innerhalb des Gesamtkollektivs (Patienten plus Kontrollen) am häufigsten aberrant methyliert waren.

Mapinfo: gibt die Position des Start-CpG-Locus der aberranten DNA-Methylierung an (Build GRCh37/hg19).

Gen: UCSC Refgene Name (Build GRCh37/hg19) für die davor genannte Mapinfo, bei – liegt kein Gen an dieser Position.

Patienten- und Kontrollen-Anzahl: die Gesamtzahl von Patienten und Kontrollen, die an dieser Stelle eine auffällige DNA-Methylierung aufweisen.

1= hypermethyliert um mindestens 20% im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollen

-1= hypomethyliert um mindestens 20% im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollen

Um die Bedeutung der Unterschiede in der DNA-Methylierung der CpG-Loci auf den Chromosomen 2 (*PAX8*), 7 (*HOXA5*) und 17 (*KCNAB3*) weiter zu untersuchen, wurden Boxplot-Abbildungen gemacht (Abbildungen 12 bis 14). Hier wurde eine zweite unabhängige Kontrollgruppe, bestehend aus 10 gesunden Männern, miteinbezogen. Diese wurde in die Berechnungen der aberranten DNA-Methylierung nicht miteinbezogen und zeigt somit unabhängig, wie die abweichende DNA-Methylierung der einzelnen Patienten an den einzelnen Loci zu bewerten ist. Man sieht in den Abbildungen 12 bis 14 nebeneinander die mittleren DNA-Methylierungswerte der Kontrollgruppe eins (ursprüngliche Kontrollgruppe dieses Projekts, bestehend aus 19 Kindern), der Kontrollgruppe zwei (unabhängige Kontrollgruppe) und der Patientengruppe (gebildet aus 81 Patienten) über alle 7 aufeinanderfolgenden CpG-Loci. Neben diesen drei Gruppen sind einzeln die mittleren DNA-Methylierungswerte der Patienten mit aberranter DNA-Methylierung abgebildet.

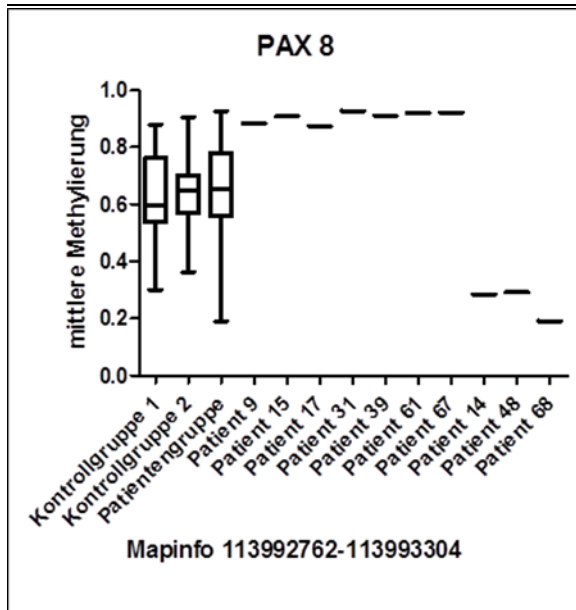


Abbildung 12: Boxplot der mittleren DNA-Methylierung eines aberranten Blockes in *PAX8*
 Mapinfo: Start- und Endpunkt der aberranten DNA-Methylierung (Build GRCh37/hg19)
 Kontrollgruppe 1: ursprüngliche Kontrollgruppe des Projekts (19 Kinder)
 Kontrollgruppe 2: unabhängige Kontrollgruppe (10 erwachsene Männer)
 Patientengruppe: Gesamtgruppe der 81 Patienten
 Rechts neben diesen drei Gruppen sind die Patienten mit aberranter DNA-Methylierung abgebildet
 Mittlere Methylierung: mittlere DNA-Methylierung berechnet über alle 7 aberrant methylierten CpG in Folge von 0 bis 1 (0= 0% Methylierung, 1=100% Methylierung)

PAX8 (Abbildung 12): Sieben Patienten zeigen eine Hypermethylierung über alle 7 CpG-Loci in Folge um mindestens 20% im Vergleich zum Methylierungsmittelwert der 19 Kontrollen an den 7 CpG-Loci ($p=0,3411$, $OR=3,926$, $RR=1,257$; Fisher-Test). Mit Ausnahme von Patient 17 liegen alle Patienten über dem Maximalwert der Kontrollen. Drei der insgesamt 81 Patienten zeigen eine Hypomethylierung im Vergleich zum Methylierungsmittelwert der 19 Kontrollen ($p=0,5757$, $OR=0,6923$, $RR=0,9231$, Fisher-Test). Hierbei fällt vor allem Patient 68 mit einer mittleren DNA-Methylierung von 0,19 auf, während der Minimalwert der Kontrollen eine mittlere DNA-Methylierung von 0,30 aufweist. Die zweite, unabhängige Kontrollgruppe liegt in einem ähnlichen Bereich wie die Kontrollgruppe eins dieses Projekts.

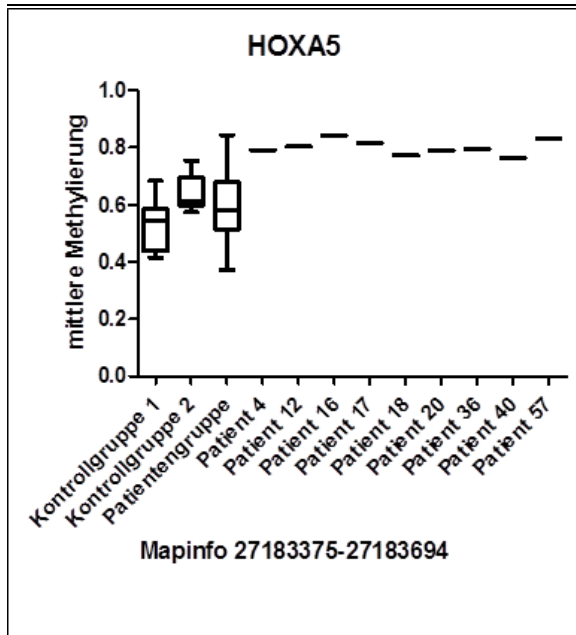


Abbildung 13: Boxplot der mittleren DNA-Methylierung eines aberranten Blockes in *HOXA5*
 Mapinfo: Start- und Endpunkt der aberranten DNA-Methylierung (Build GRCh37/hg19)
 Kontrollgruppe 1: ursprüngliche Kontrollgruppe des Projekts (19 Kinder)
 Kontrollgruppe 2: unabhängige Kontrollgruppe (10 erwachsene Männer)
 Patientengruppe: Gesamtgruppe der 81 Patienten
 Rechts neben diesen drei Gruppen sind die Patienten mit aberranter Methylierung abgebildet
 Mittlere Methylierung: mittlere DNA-Methylierung berechnet über alle 7 aberrant methylierten CpG in Folge von 0 bis 1 (0= 0% Methylierung, 1=100% Methylierung)

HOXA5 (Abbildung 13): Alle neun Patienten mit aberranter DNA-Methylierung zeigen im Vergleich zum Methylierungsmittelwert der 19 Kontrollen eine Hypermethylierung ($p=0,2008$, $OR=5,110$, $RR=1,264$; Fisher-Test). An dieser Stelle liegen alle Patienten über dem Maximalwert der Kontrollen. Das Ergebnis wird allerdings durch die zweite, unabhängige Kontrollgruppe eingeschränkt, da hier die mittleren DNA-Methylierungswerte zwischen den Werten der Patienten mit aberranter DNA-Methylierung und den Werten der Kontrollgruppe eins liegen.

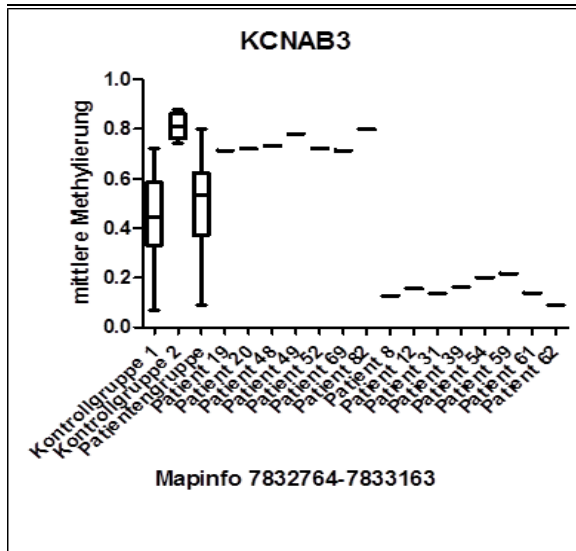


Abbildung 14: Boxplot der mittleren DNA-Methylierung eines aberranten Blockes in *KCNAB3*
 Mapinfo: Start- und Endpunkt der aberranten DNA-Methylierung (Build GRCh37/hg19)
 Kontrollgruppe 1: ursprüngliche Kontrollgruppe des Projekts (19 Kinder)
 Kontrollgruppe 2: unabhängige Kontrollgruppe (10 erwachsene Männer)
 Patientengruppe: Gesamtgruppe der 81 Patienten
 Rechts neben diesen drei Gruppen sind die Patienten mit aberranter Methylierung abgebildet
 Mittlere Methylierung: mittlere DNA-Methylierung berechnet über alle 7 aberrant methylierten CpG in Folge von 0 bis 1 (0= 0% Methylierung, 1=100% Methylierung)

KCNAB3 (Abbildung 14): An dieser Position fällt zunächst eine sehr breite mittlere DNA-Methylierung sowohl der Kontroll- als auch der Patientengruppe auf. Die Kontrollgruppe eins hat einen Minimalwert von 0,068 und einen Maximalwert von 0,72. Sieben der 81 Patienten zeigen eine Hypermethylierung um mindestens 20% im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollgruppe, im Vergleich dazu zeigt sich in der Kontrollgruppe keine aberrante DNA-Methylierung über 7 CpG-Loci in Folge ($p=0,3411$, $OR=3,926$, $RR=1,257$; Fisher-Test). Die Hypermethylierung liegt jeweils nur knapp über dem Maximalwert der Kontrollen, mit Ausnahme der Hypermethylierungen bei Patient 49 und Patient 82. Sehr auffällig ist hier die mittlere DNA-Methylierung der Kontrollgruppe zwei, die deutlich höhere DNA-Methylierungswerte zeigt als die Kontrollgruppe eins.

Acht Patienten zeigen eine Hypomethylierung um mindestens 20% im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollgruppe, welche bei keinem Patienten unter dem Minimalwert der Kontrollgruppe eins liegt; eine von 19 Kontrollen zeigt in diesem Bereich ebenfalls eine Hypomethylierung (siehe Tabelle 2, Nummer 9) ($p=1,0000$, $OR=1,973$, $RR=1,108$; Fisher-Test). Im Vergleich zur Kontrollgruppe zwei liegen die mittleren DNA-Methylierungswerte der Patienten

mit Hypomethylierung deutlich niedriger, sodass die unabhängige Kontrollgruppe an dieser Stelle das Ergebnis einer Hypomethylierung betont.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass es an allen drei Lokalisationen Patienten mit aberranter DNA-Methylierung gibt, dieses Ergebnis aber keine statistische Signifikanz erreicht ($p > 0,05$). Dieses könnte sowohl an dem verhältnismäßig kleinen Kontrollkollektiv liegen (19 Kontrollen verglichen mit 81 Patienten), als auch an der sehr engen Vorgabe der aberranten DNA-Methylierung, welche sich über 7 CpG in Folge erstrecken muss.

3.4.3 Betrachtung einzelner Patienten

Im letzten Schritt der patientenbezogenen DNA-Methylierungsanalyse wurde die aberrante DNA-Methylierung bei jedem einzelnen Patienten untersucht. Die Bedingung war wiederum, dass mindestens 7 aufeinander folgende CpG-Loci im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollen entweder hyper- oder hypomethyliert vorliegen müssen. Diejenigen aberranten DNA-Methylierungsblöcke, die bereits in der Kleingruppenanalyse auffällig waren (siehe Tabelle 2), wurden in diesem Teil ausgeschlossen. Insgesamt zeigte sich ein inhomogenes Verteilungsmuster. Zwei Patienten wiesen gemäß den oben gestellten Bedingungen keinen solchen aberrant methylierten Block auf (Patienten 21 und 72), ein anderer hingegen 18 (Patient 62). Auffällig waren hier 5 Patienten, die alle einen Hypermethylierungsblock in *RNF39* zeigten, sowie 2 Patienten, die eine Hypermethylierung von *NLRP2* aufwiesen (Abbildungen 15 und 16). In den Abbildungen 15 und 16 sind die Hypermethylierungsblöcke in *NLRP2* und *RNF39* im Vergleich zu Minimum und Maximum der Kontrollgruppe dieses Projektes abgebildet.

NLRP2

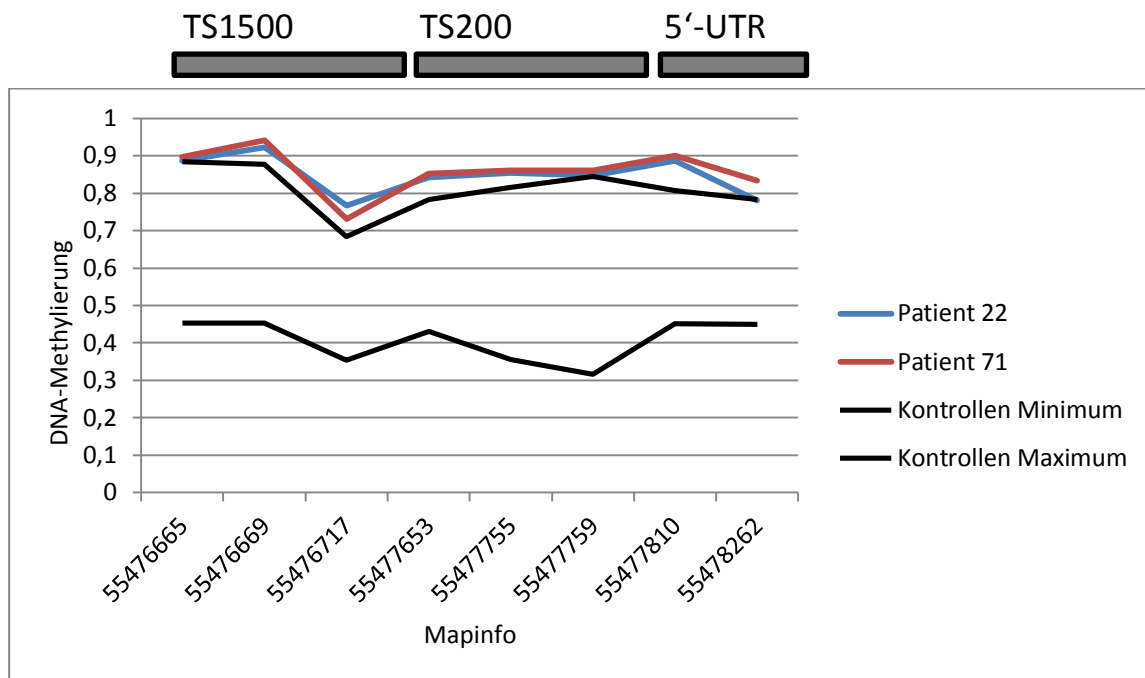


Abbildung 15: Liniendiagramm von *NLRP2*.

Darstellung der Hypermethylierung der Patienten 22 (blau) und 71 (rot) im Vergleich zu Minimum und Maximum der Kontrollen (schwarz) über 7 aufeinanderfolgende CpG-Loci.

DNA-Methylierung: DNA-Methylierungslevel von 0 bis 1 (0= 0% Methylierung, 1= 100% Methylierung).

Mapinfo: gibt die jeweilige Position des CpG-Locus auf Chromosom 19 an (Build GRCh37/hg19).

TS1500, TS200, 5'-UTR: UCSC Refgene Group

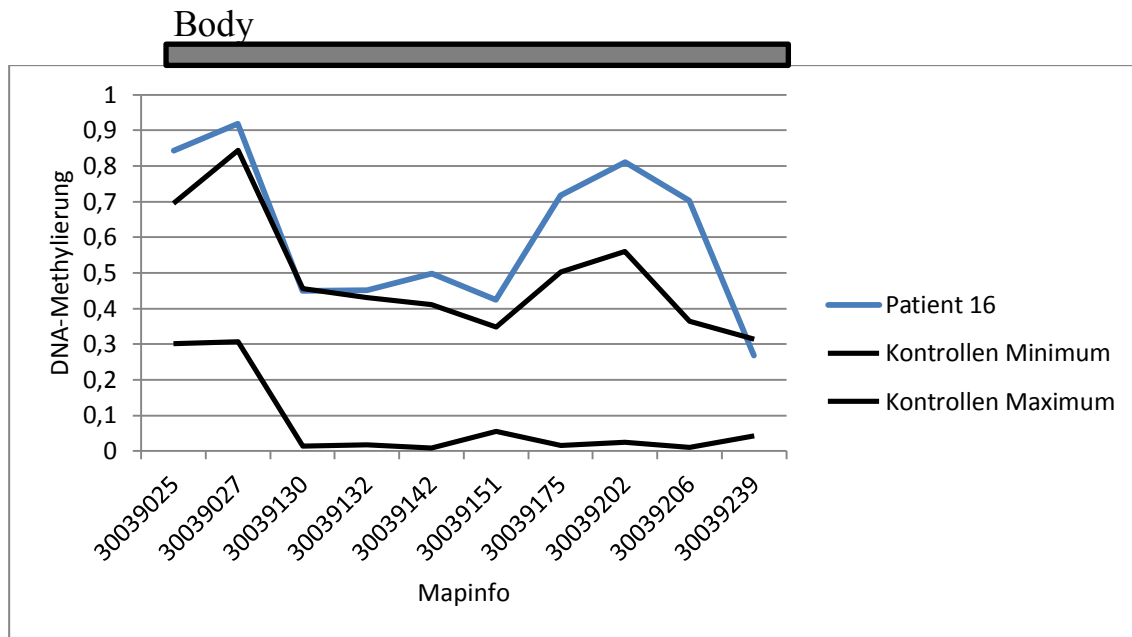


Abbildung 16: Liniendiagramm von *RNF39*.

Darstellung der Hypermethylierung von Patient 16 (blau) im Vergleich zu Minimum und Maximum der Kontrollen (schwarz) über 7 aufeinanderfolgende CpG-Loci.

DNA-Methylierung: DNA-Methylierungslevel von 0 bis 1 (0= 0% Methylierung, 1= 100% Methylierung).

Mapinfo: gibt die jeweilige Position des CpG-Locus auf Chromosom 6 an (Build GRCh37/hg19).

Body: UCSC Refgene Group

3.5. Weiterführende Analysen nach Abschluss dieser Arbeit

Nach Abschluss dieser Arbeit erfolgten aufbauend auf den vorliegenden Daten mit demselben Patienten- und Kontrollkollektiv weiterführende Analysen (Kolarova et al. 2015).

Zunächst wurde eine erweiterte Analyse in Bezug auf Imprintingstörungen durchgeführt. Die von Court et al. im Jahr 2014 neu identifizierten geprägten Gene, die mittels 889 CpG-Loci auf dem Infinium *HumanMethylation45 BeadChip* abgebildet werden, wurden auf Imprintingstörungen untersucht. 4 Patienten zeigten eine Hypermethylierung im Bereich von *BLCAP* (Patienten 22, 28, 38 und 45), 3 Patienten eine Hypermethylierung in *PPIEL* (Patienten 4, 47, 59), außerdem zeigte der Patient mit der Hypomethylierung in *MEG3* zusätzlich eine Hypermethylierung in *MEG8* (Patient 64). Ein weiterer Patient wies eine Hypermethylierung in *IGF2R* auf (Patient 15) und ein Patient (Patient 12) zeigte eine Hypermethylierung in *MCTS2/HM13* (Kolarova et al. 2015).

In einem nächsten Schritt erfolgte eine erneute patientenbezogene Analyse mit modifizierten Bedingungen. Für jedes analysierte CpG jedes Patienten wurde eine Differenz zum minimalen und maximalen Methylierungswert der Kontrollen berechnet. CpG-Loci, bei denen der

avg.beta-Wert um 0.2 höher als der maximale Methylierungswert in der Kontrollgruppe lag, wurden markiert, und ebenso wurden CpG-Loci, bei denen der avg.beta-Wert um 0.2 niedriger als der minimale Methylierungswert in der Kontrollgruppe lag, markiert. Im nachfolgenden Schritt wurde dann ein `SlidingWindow` angewendet, um jeweils 5 CpG-Loci in Folge zu analysieren. Wenn 3 von 5 CpG-Loci in diesem „Fenster“ markiert waren, wurde dieser Bereich als aberrant methyliert definiert. Auf diesem Weg ergaben sich 157 aberrant methylierte Regionen, die 107 Genen entsprachen. Es erfolgte dann ein Abgleich mit einer Liste von Gilissen et al. aus dem Jahr 2014, in der Gene aufgelistet sind, die in einem bekannten Zusammenhang mit einer Intelligenzstörung stehen. Es konnten hier Überlappungen gezeigt werden in *COLEC11*, *SHANK2*, *GLI2* und *KCNQ2* (Kolarova et al. 2015).

Schließlich wurden zur erweiterten Validierung Bisulfit-Pyrosequenzierungen durchgeführt, und zwar für 3 geprägte Gene (*BLCAP*, *PPIEL*, *FAM50B*) sowie für die 4 Gene, bei denen bereits ein Zusammenhang zu einer Intelligenzstörung hergestellt worden war (*GLI2*, *SHANK2*, *KCNQ2* und *COLEC11*) (Gilissen et al. 2014). Der Assay der *KCNQ2*-Analyse bestand die internen Kontrollen nicht. Es ließen sich alle in der Array-Analyse identifizierten Hypo- und Hypermethylierungen bestätigen, lediglich die Bisulfitpyrosequenzierung von *PPIEL* erbrachte ein abweichendes Ergebnis (Kolarova et al. 2015).

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe von genomweiten Analysen der DNA-Methylierung an peripherem Blut von Patienten, bei denen eine Störung der geistigen Entwicklung besteht und bei denen trotz umfangreicher Voruntersuchung keine Ursache gefunden worden ist, mögliche epigenetische Ursachen für eine Intelligenzstörung zu identifizieren. Es war möglich anhand von 254 differentiell methylierten CpG-Loci zwischen Patienten- und Kontrollgruppe zu unterscheiden. Ebenso konnten im Patientenkollektiv drei Imprinting-Störungen diagnostiziert werden. Als drittes Ergebnis gelang es bei der Analyse der individuellen DNA-Methylierungsmuster jedes einzelnen Patienten, Blöcke aberranter DNA-Methylierung sowohl in Kleingruppen als auch bei einzelnen Patienten zu finden. Im folgenden Abschnitt wird zunächst die Arbeit unter technischen Aspekten mit dem Schwerpunkt auf Material und Methodik diskutiert. Danach sollen die erzielten Ergebnisse kritisch betrachtet und ein Fazit gezogen werden. Anschließend wird der Versuch unternommen, einen Ausblick zu zeigen, wie weiterführende Forschung in diesem Bereich aussehen könnte.

4.1 Technische Diskussion

4.1.1 Material

Die Analyse des DNA-Methylierungsmusters erfolgte aus peripherem Blut, dessen Entnahme die erste mögliche Fehlerquelle für die Array-Analyse auf dem Infinium *HumanMethylation450 BeadChip* darstellt, da hierfür verschiedene Hilfsmittel benutzt wurden, die Durchführung je nach Untersucher unterschiedlich gehandhabt wurde und anschließend die Lagerung des Blutes unterschiedlich lange und bei verschiedenen Temperaturen erfolgte. Dies kann zu einer unterschiedlich starken Fragmentierung bei einer vergleichenden Analyse der DNA führen, wodurch die DNA-Methylierungsanalyse mittels der Bead Chip Technologie verfälscht werden kann (Thirlwell et al. 2010). Nach der Blutentnahme wurde die DNA extrahiert. Die Studie wurde mit Patienten aus verschiedenen Instituten für Humangenetik in Schleswig-Holstein und zusätzlich mit Kontrollen aus dem Institut für Humangenetik der polnischen Akademie der Wissenschaften in Poznan, Polen, durchgeführt; die verschiedenen Institute extrahierten die DNA mittels unterschiedlicher Techniken, wodurch möglicherweise kleine Unregelmäßigkeiten entstanden sind. Außerdem war es im Nachhinein nicht möglich, bei allen Proben das Extraktionsverfahren zu bestimmen. Um hier Fehler zu vermeiden, wurde allerdings nach der DNA-Extraktion eine Qualitätskontrolle in zwei Schritten durchgeführt.

Der erste Schritt bestand aus einer DNA-Konzentrationsbestimmung. Im zweiten Schritt wurde mithilfe einer Gel-Elektrophorese überprüft, ob die DNA in einer fragmentierten Form vorliegt, da die Bead Chip Technologie eine minimale DNA-Länge von 1kb voraussetzt, um die DNA zu amplifizieren (Thirlwell et al. 2010). Durch diese beiden Schritte, die auch zum Ausschluss einzelner Proben aus der Studie führten, wurde sichergestellt, dass weder eine zu geringe DNA-Konzentration noch eine DNA-Fragmentierung zu einer Störung der Array-Analyse führten.

Das nächste mögliche Problem der Analyse, welches ebenfalls Ursache für eine differentielle DNA-Methylierung sein könnte, entstand durch die Zusammenstellung der Patientengruppe: Die Patientengruppe besteht aus 81 Patienten im Alter von 0 bis 25 Jahren. Das Genom an sich ist im Wesentlichen in allen Zellen gleich und bleibt im Laufe des Menschenlebens konstant, wohingegen sich das Epigenom von Zelle zu Zelle unterscheidet und sich im Laufe der Zeit und durch Umwelteinflüsse verändert. Das Epigenom scheint vor allem in bestimmten Lebensabschnitten flexibel auf Umwelteinflüsse zu reagieren, wie beispielsweise in der Zeit der Perinatalperiode und der Pubertät (Gibney und Nolan 2010; Jirtle und Skinner 2007; Szyf 2009). Daher sollte insbesondere die Tatsache, dass einige Patienten schon in der Pubertät sind oder diese bereits abgeschlossen haben, beachtet werden. So hat man zum Beispiel in einer genomweiten DNA-Methylierungsanalyse des weiblichen Ratten-Hypothalamus herausgefunden, dass Bereiche auf verschiedenen Chromosomen mit dem Beginn der Pubertät entweder mehr oder weniger methyliert vorliegen, dass also der Beginn der Pubertät mit einer Veränderung des DNA-Methylierungsstatus zusammenhängt (Ojeda et al. 2010). Es sollte also als Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass schon die relativ geringe Altersspanne von 25 Jahren innerhalb der Patientengruppe für unterschiedliche Ergebnisse verantwortlich sein könnte.

Außerdem muss in Betracht gezogen werden, dass einige Patienten und auch Kontrollen bei der Untersuchung noch sehr jung waren. Insbesondere Patienten mit einer muskulären Hypotonie oder einer unspezifischen Entwicklungsverzögerung haben möglicherweise im weiteren Verlauf eine altersentsprechende normale geistige und körperliche Entwicklung gezeigt, aufgrund des vorliegenden Studiendesigns war eine Verlaufsbeobachtung allerdings nicht möglich.

Ein weiteres Problem ergibt sich bei der Betrachtung der Symptomatik der Patienten. Einschlusskriterien für diese Studie waren eine Intelligenzstörung und zusätzlich möglichst mindestens eins der folgenden Symptome: Kleinwuchs, Anfallsleiden, EEG-Auffälligkeiten ohne beobachtete epileptische Anfälle, Adipositas und muskuläre Hypotonie. Zwar erfüllten alle

Patienten die genannten Einschlusskriterien, doch es zeigte sich anhand der erzielten Ergebnisse im Laufe der Analyse, dass die Patientengruppe insgesamt inhomogen ist. So wäre es vielleicht effektiver gewesen, nur Patienten mit einer kindlichen Epilepsie miteinander zu vergleichen oder nur Patienten mit muskulärer Hypotonie. In unserer Studie waren aber insgesamt für eine solche Analyse von Untergruppen zu wenig Patienten eingeschlossen. Dies liegt zum einen daran, dass der mögliche Patientenpool zu klein war, zum anderen aber auch an finanziellen Gründen, weil die Kosten für eine Array-Analyse mittels des Infinium *HumanMethylation450 BeadChip* relativ hoch sind.

4.1.2 Methoden

4.1.2.1 Array-Analyse mittels Infinium *HumanMethylation450 BeadChip*

Die DNA-Methylierungsanalyse mittels des Infinium *HumanMethylation450 BeadChip* erfolgte nach Angaben des Herstellers anhand des Illumina Infinium *HD Methylation Assay, Manual Protocol* (Illumina Proprietary 2010). Die Durchführung funktionierte zunächst ohne Probleme, bei der Auswertung stellte sich allerdings heraus, dass eine Probe nicht ausgewertet werden konnte, da hier ein Fehler während des Scan-Prozesses auftrat und diese Probe automatisch von der Scan-Software ausgeschlossen wurde (iScan, Illumina, San Diego, CA, USA). Die Vorteile dieser genomweiten DNA-Methylierungsanalyse liegen unter anderem darin, dass ein großer Bereich des menschlichen Methyloms untersucht werden kann, denn es werden 485.577 Positionen (482.421 CpG-Loci, 3.091 non-CpG Loci und 65 SNPs) des menschlichen Genoms analysiert. Da zu Beginn dieser Studie noch keine Hypothese vorlag, an welchen CpG-Loci die differentielle DNA-Methylierung bei Patienten mit Intelligenzstörung vorliegen könnte, war es wichtig, einen möglichst großen Bereich des Genoms abzudecken.

Die Validierung der Ergebnisse erfolgte auf zwei Wegen: zum einen statistisch mittels eines Vergleichs zum Vorgängermodell, dem 27K Array (Infinium *HumanMethylation27 BeadChip*, Illumina, San Diego, USA), zum anderen praktisch mittels der Durchführung einer Pyrosequenzierung. Im Vergleich zum Vorgängermodell, dem 27K Array, zeigte sich eine gute Übereinstimmung, sowohl in eigenen Versuchen (siehe oben) als auch in der Literatur (Bibikova et al. 2011; Sandoval et al. 2011). In der Literatur wird diese Analyse zusätzlich als robust beschrieben (Sandoval et al. 2011). Die zweite Überprüfung der Ergebnisse erfolgte bei der Validierung der Hypomethylierung in *MEG3* mittels Pyrosequenzierung (siehe Abbildung

9). Auch hier zeigte sich eine gute Übereinstimmung (mittlere DNA-Methylierung der Pyrosequenzierung 12,155%, [Mapinfo 101293787-101293869, Build GRCh37/hg19], mittlere DNA-Methylierung der in dieser Region liegenden, auf dem Array analysierten CpG 10,01% [Mapinfos 101293726 und 101293856, Build GRCh37/hg19]). Damit bestätigt die Pyrosequenzierung das Ergebnis der Array-Analyse. Der hier gebrauchte Array ist bereits ein Folgemodell des 27K Array, und die CpG-Loci-Auswahl wurde von einer Gruppe von 22 Wissenschaftlern zusammengestellt (Bibikova et al. 2011), deshalb kann man davon ausgehen, dass viele der in der Forschung bisher relevanten Positionen abgedeckt sind. Weitere Vorteile dieser Technik liegen in der geringen Menge an benötigter DNA (0,5µg) und in der relativ schnellen Durchführung bis zur Erfassung der DNA-Methylierungsrohdaten.

Der Infinium *HumanMethylation450 BeadChip* ist ein bereits weiterentwickeltes Folgemodell, man darf aber nicht außer Acht lassen, dass er zu Beginn dieser Arbeit erst relativ kurzzeitig kommerziell vertrieben wurde. Die Validierung in Studien hat zwar gezeigt, dass er robust arbeitet (Sandoval et al. 2011), dennoch war er bisher nicht in vielen Forschungsprojekten eingesetzt worden. Ein weiteres Problem ist, dass das Funktionsprinzip dieses Arrays sich im Vergleich zu seinem Vorgänger geändert hat, denn es werden zwei Assay-Typen benutzt, der Infinium I und der Infinium II Assay. Die β -Values ($\beta = \text{Intensität des methylierten Allels (M)} / (\text{Intensität des unmethylierten Allels (U)} + \text{Intensität des methylierten Allels (M)} + 100)$) (Bibikova et al., 2011), die mittels des Infinium I und II ermittelt werden, sind leicht unterschiedlich (Bibikova et al. 2011; Dedeurwaerder et al. 2011), denn der Infinium II Assay ist weniger empfindlich für die Detektion extremer Methylierungswerte (0 und 1) als der Infinium I Assay (Dedeurwaerder et al. 2011). Trotzdem wird die Erkennung differentiell methylierter Sequenzen hierdurch nicht signifikant beeinträchtigt (Bibikova et al. 2011). Mittlerweile wurden verschiedene statistische Berechnungen vorgeschlagen, um diesen Fehler zu minimieren (Maksimovic et al. 2012; Dedeurwaerder et al. 2011). Zu dem Zeitpunkt unserer Analysen gab es noch kein etabliertes Verfahren für die Normalisierung der Werte des Infinium I und II Assays. Daher wurde bei unseren Berechnungen dieser Fehler nicht durch ein zweites Verfahren korrigiert, sondern basierend auf der internen Normalisierung durchgeführt.

Insgesamt kann man aber festhalten, dass sowohl die Validierung zum Vorgängermodell als auch die eigene Kontrolle mittels einer Pyrosequenzierung eine gute Übereinstimmung gezeigt haben. Somit kann man davon ausgehen, dass die Methylierungswerte des Infinium *HumanMethylation450 BeadChip* glaubwürdig sind.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 DNA-Methylierungsanalysen

254 differentiell methylierte Loci im Vergleich der Patienten- mit der Kontrollgruppe:

Um differentiell methylierten Sequenzen zu ermitteln, wurde eine T-Test Analyse (Qlucore OMICS explorer, version 3.0, Qlucore, Lund, Schweden) durchgeführt. Hierdurch war es möglich, in einer hierarchischen Clusteranalyse 254 differentiell methylierte Loci zu identifizieren, die eine Unterscheidung von Patienten- und Kontrollgruppe erlauben. Allerdings fiel auf, dass die DNA-Methylierungsmuster der Patienten nicht nur im Vergleich zur Kontrollgruppe, sondern auch im Vergleich der Patienten untereinander heterogen sind, wie die hierarchische Clusteranalyse zeigte (Abbildung 5). Dies zeigt, dass das Patientenkollektiv kein einheitliches DNA-Methylierungsmuster aufweist. Dieses könnte ein Ansatzpunkt für eine Folgestudie sein, in der basierend auf diesem Projekt zum Beispiel nur Patienten mit Störungen der geistigen Entwicklung und zusätzlich kindlicher Epilepsie in die Patientengruppe eingeschlossen würden (vgl. dazu auch Hinweise innerhalb der technischen Diskussion, S.42).

Bei genauerer Betrachtung der 254 differentiell methylierten Loci ($FDR < 0,01$, $\Delta\beta > 0,1$) fielen Anreicherungen im Bereich von Enhancerelementen ($p < 0,01$, $OR = 1,449$; χ^2 -test) und N-Shelves ($p = 0,032$, $OR = 1,671$) auf. Enhancer können die Gen-Expression gewebe-spezifisch oder angepasst an den Entwicklungszeitpunkt steigern (Klamut et al. 1996), N-Shelves bilden den Bereich 2-4 kb entfernt von einer CpG-Insel, wobei N-Shelf den Bereich upstream (N= north) der CpG-Insel beschreibt (Bibikova et al. 2011). Abreicherungen hingegen ergaben sich im Bereich der CpG-Inseln ($p < 0,0001$, $OR = 0,3102$). Die aberrante DNA-Methylierung betrifft also vor allem die genspezifisch regulatorischen Elemente (Enhancer, N-Shelves).

Drei Signalwege mit aberranter DNA-Methylierung:

Bei der Gene-Ontology-Analyse mittels des GOrilla-Tools zur Untersuchung, ob Gene einzelner Signalwege überdurchschnittlich häufig aberrant methyliert sind, zeigten sich die Signalwege der Antigen-Prozessierung und -Präsentation ($p = 10^{-5}$ bis 10^{-7}) und der Interferon-Gamma-vermittelte-Signalweg ($p = 10^{-3}$ bis 10^{-5}) überdurchschnittlich häufig betroffen (siehe Abbildung 6). Alle diese Signalwege sind Bestandteile des Immunsystems und unter anderem wichtig für die Erkennung von Antigenen sowie für die Aktivierung von Makrophagen (Schütt und Bröker 2009a, b, c, d). Auf einen kausalen Zusammenhang zwischen der hier

identifizierten aberranten DNA-Methylierung und einer Störung der geistigen Entwicklung ergab sich in der Literaturrecherche bisher kein Hinweis. Einen möglichen Hinweis auf einen anderweitigen Zusammenhang ergibt sich allerdings aus der Feststellung, dass MHC-Klasse-I Gene (hierzu gehören die *HLA*-Antigene *HLA-A*, *HLA-B* und *HLA-C*, Schütt und Bröker 2009d) zusätzlich zu ihrer Aufgabe innerhalb der Immunantwort auch andere Funktionen haben, unter anderem im zentralen Nervensystems (Corvin und Morris 2014; Elmer und McAllister 2012; Shatz 2009). MHC-Klasse-I Gene werden sowohl im sich noch entwickelnden als auch im erwachsenen Gehirn exprimiert und spielen eine Rolle bei der Entwicklung und der Plastizität des zentralen Nervensystems (Elmer und McAllister 2012; Shatz 2009; Corriveau et al. 1998). Es ist auch vorstellbar, dass eine veränderte Funktion von MHC-I zu einer Veränderung des Lernens und des Gedächtnisses führen kann (Shatz 2009). Dies lässt einen Zusammenhang zwischen differentiell methylierten MHC-Klasse-I Genen und dem Phänotyp der Intelligenzstörung vermuten. Die Funktion des MHC-I im zentralen Nervensystem ist aber noch nicht abschließend erforscht (Elmer und McAllister 2012). Um die Pathologie der gehäuft abnormen DNA-Methylierung in den Bereichen der MHC-Gene zu verstehen, wären hier gegebenenfalls Zielgewebe-Analysen nötig, die allerdings im zentralen Nervensystem erfolgen müssten und somit nicht praktikabel sind.

4.2.1.3 Untersuchung auf bekannte Imprinting-Störungen

Die Untersuchung auf bekannte Imprinting-Störungen wurde in Anlehnung an eine Studie von Poole et al. aus dem Jahr 2010 durchgeführt. In dieser Untersuchung wurden 90 Kinder mittels Pyrosequenzierung in Bezug auf bekannte Imprinting-Störungen untersucht. Vorher war eine submikroskopische Chromosomenstörung durch eine Array-CGH-Untersuchung ausgeschlossen worden. Bei zwei Patienten wurde ein bis dahin nicht diagnostiziertes Imprinting-Syndrom gefunden. Ein Patient zeigte eine isolierte Hypomethylierung von *IGF2PO*, welche mit dem Russell-Silver-Syndrom assoziiert ist, und ein anderer Patient wies eine Hypomethylierung von *KvDMR* auf, welches zu der Diagnose des Beckwith-Wiedemann Syndrom führte. In unserer Studie zeigten sich ebenfalls bei zwei Patienten aberrante DNA-Methylierungen an Lokalisationen, denen ein klinischer Phänotyp zugeordnet werden kann; zum einen zeigte sich bei einem Patienten eine Hypomethylierung in *MEG3*, zum anderen eine Hypermethylierung eines Patienten in *IGF2*. Dies zeigt deutlich, dass Imprinting-Syndrome unterdiagnostiziert sind. Das Problem der Diagnostik dieser Syndrome ist, dass

man im klinischen Alltag aus Kosten- und Zeitgründen keine genomweite DNA-Methylierungsanalyse durchführt, sondern spezifisch nach dem Syndrom sucht, auf das die Symptomatik des Patienten hinweist. Das Stellen der Diagnose kann aber durch die phänotypische Variabilität der einzelnen Syndrome erschwert sein (Poole et al. 2010, Poole et al. 2013). Obwohl es noch keine kausale Therapie für diese Syndrome gibt, kann aber durch eine gesicherte Diagnose, den Vergleich zu Verlaufsbeschreibungen anderer Fälle und eine bestmögliche symptomatische Therapie den Patienten und ihren Familien oftmals geholfen werden.

Hypomethylierung in *MEG3*:

Bei dem Patienten mit der Hypomethylierung in *MEG3*, welche sich in der Pyrosequenzierung bestätigte, kann aufgrund der Anonymisierung der Proben nicht eindeutig geklärt werden, welcher Mechanismus zu der Hypomethylierung führte, da hierfür eine Mikrosatelliten-Analyse an Blutproben des Patienten und seiner Eltern durchgeführt werden müsste. Das Gen *MEG3* liegt auf Chromosom 14 und ist ein geprägtes Gen, welches präferentiell vom maternalen Allel transkribiert wird (Miyoshi et al. 2000), es gehört zusammen mit mehreren anderen Genen zu einem Imprinting-Locus auf 14q32 (Ioannides et al. 2014). Um dem Entstehungsmechanismus der Hypomethylierung näher zu kommen, kann versucht werden, über die Symptomatik des Patienten Rückschlüsse zu ziehen. Die Informationen, die uns zu dem Patienten zur Verfügung stehen, sind leider begrenzt. So liegen zum Beispiel keine Beschreibungen der fazialen Auffälligkeiten des Patienten vor und auch keine Informationen zu Statur und Handgröße. Seine Entwicklungsverzögerung wurde eher als mild beschrieben. Insgesamt stehen die phänotypischen Merkmale in Einklang mit der Diagnose eines UPD 14 mat-like-Syndroms, dem sogenannten Temple-Syndrom. Zu diesem gehört, dass die Patienten zum Geburtstermin klein sind, eine kurze Statur, eine Hypotonie, eine Skoliose, kleine Hände und verschiedene faziale Auffälligkeiten haben, die sich unter anderem in einer hohen breiten Stirn und einer fleischigen Nasenspitze zeigen. Ebenso zeigen die Patienten eine Entwicklungsverzögerung und einen frühen Pubertätsbeginn (Sutton und Shaffer 2000; Temple et al. 2007). Das Temple-Syndrom ist assoziiert mit einer fehlerhaften Regulation der Expression von Genen des Imprinting-Locus auf 14q32. Es gibt insgesamt vier mögliche Ursachen für das Temple-Syndrom, zum einen die maternale uniparentale Disomie, welche die mit Abstand häufigste Ursache darstellt, zum anderen aber auch Kopienzahlen-Veränderungen (Deletionen und Duplikationen), epigenetische Veränderungen und Mutationen von exprimierten kodierenden Genen (Ioannides et al. 2014), letztere wurden aber bisher beim Menschen nicht beo-

bachtet. Insgesamt ist die Diagnose einer UPD außer der UPD des Chromosoms 15 in der genetischen Beratung selten und das Wissen über andere Krankheitsbilder ist rar (Kotzot und Utermann 2005). Dies zeigt sich auch in einer Studie von Bens et al. aus dem Jahr 2013. In dieser Studie wurden Kinder, welche bei Geburt kleiner und oder leichter als zwei Standardabweichungen im Vergleich zu Durchschnittsgröße beziehungsweise Durchschnittsgewicht waren, ebenfalls auf bekannte Imprintingstörungen untersucht. In einer Gruppe von 98 Kindern wurde unter anderem ein Kind mit einem UPD 14 mat-like Syndrom (Temple-Syndrom) gefunden, welches durch eine Epimutation ausgelöst wurde. Dies zeigt, dass eine Imprinting-Störung im Bereich von *MEG3* relativ wenig bekannt und unterdiagnostiziert ist

Hypermethylierung in *IGF2*:

Bei der Suche nach weiteren Imprinting-Störungen zeigte sich bei Patient 62 eine Hypermethylierung im Bereich von *IGF2*. Das Gen *IGF2* kodiert für den fetalen Wachstumsfaktor Insulin-like growth factor 2 und wird paternal exprimiert (Reik und Maher 1997). Es liegt auf Chromosom 11p15.5, wie auch mehrere andere genomisch geprägte Gene, und ist ein Kandidatengenen für das Beckwith-Wiedemann Syndrom (Weksberg und Squire 1996). Wie bereits im Ergebnisteil erläutert, gelang die Bestätigung der Hypermethylierung mittels MLPA nicht, da von dem verwendeten MLPA-Assay nicht die gleichen CpG-Loci von *IGF2* analysiert werden wie von dem Infinium *HumanMethylation450 BeadChip*. Die MLPA zeigte allerdings, dass kein klassisches Beckwith-Wiedemann-Syndrom vorliegt, da die auf der MLPA analysierten CpG-Loci ein unauffälliges DNA-Methylierungsmuster sowie keine Kopienzahlveränderungen aufwiesen. Zu der Symptomatik des Beckwith-Wiedemann Syndroms gehören verschiedene Entwicklungsstörungen wie Bauchwanddefekte, Gewebe- und Organhyperplasien, überdurchschnittliches Wachstum prä- und postnatal sowie ein erhöhtes Risiko für embryonale Tumore (Weksberg und Squire 1996; Reish et al. 2002). Aufgrund der Symptomatik des Patienten (siehe oben) wäre sicherlich keine molekulargenetische Diagnostik im Hinblick auf ein Beckwith-Wiedemann Syndrom erfolgt, da der Patient keines dieser Symptome zeigt und zusätzlich eine Intelligenzstörung aufweist, welche klassischerweise nicht zu einem Beckwith-Wiedemann-Syndrom gehört. Man muss auch in Betracht ziehen, dass die Hypermethylierung ein falsch positives Ergebnis der Array-Analyse sein könnte. Um dieses sicher auszuschließen, müssten mittels eines zweiten Verfahrens, zum Beispiel der Pyrosequenzierung, dieselben Loci der Array-Analyse erneut betrachtet werden. Da sich aber die Hypomethylierung in *MEG3*, die ebenfalls durch eine Heatmap-Darstellung herausgefunden wurde,

durch eine Pyrosequenzierung verifizieren ließ, wird auch hier von einer weiteren Imprinting-Störung ausgegangen.

Hypomethylierung in *FAM50B*:

Aufgrund neu identifizierter geprägter Gene (Nakabayashi et al. 2011; Court et al. 2014) wurde eine erweiterte Analyse auf DNA-Methylierungsstörungen in diesen geprägten Genen (Tabelle 5, im Anhang) durchgeführt. Es zeigte sich eine Hypomethylierung in der DMR von *FAM50B* (Abbildung 11). *FAM50B* ist ein Retrotransposon, welches von *FAM50A/XAP5* auf Chromosom Xq28 abstammt (Sedlacek et al. 1999; Nakabayashi et al. 2011). Es ist ein paternal exprimiertes Gen (Nakabayashi et al. 2011). *FAM50B* liegt auf Chromosom 6p25, die Funktion des Genprodukts ist noch unbekannt (Zhang et al. 2011). Es ist bisher noch kein kausaler Zusammenhang zwischen einer DNA-Methylierungsstörung in *FAM50B* und der Entwicklung einer Krankheit bekannt, deshalb wird auch noch nicht routinemäßig auf eine DNA-Methylierungsstörung in *FAM50B* getestet. Ebenfalls aus diesem Grund wurde noch kein zweites Verfahren etabliert, um eine DNA-Methylierungsstörung zu verifizieren; die Entwicklung eines spezifischen Pyrosequenzierungsassays stand bei Abschluss dieser Arbeit noch aus. Ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen einer DNA-Methylierungsstörung in *FAM50B* und einer Störung der geistigen Entwicklung könnte sich allerdings dadurch ergeben, dass *FAM50B* in embryonalem Gewebe verstärkt exprimiert wird, und somit in der pränatalen Entwicklung eine wichtige Bedeutung hat (Zhang et al. 2011).

4.2.1.2 Patientenbezogene Analyse der DNA-Methylierung

Das Ziel der patientenbezogenen DNA-Methylierungsanalyse war es, Auffälligkeiten bei Patienten aufzuzeigen, die in der allgemeinen Analyse (alle Patienten verglichen mit allen Kontrollen) nicht aufgefallen waren. Es wurde für jedes CpG eine Differenz zwischen dem DNA-Methylierungswert des Patienten und dem DNA-Methylierungsmittelwert der Kontrollen gebildet. Bei einer Differenz von mindestens 20% wurde das betroffene CpG als aberrant methyliert definiert. Eine Differenz von 20% bei der Berechnung der differentiellen Methylierung ist in der epigenetischen Forschung ein häufig gebrauchter Grenzwert (Jost et al. 2013; Masliah et al. 2013; Martino et al. 2013). Dann wurde nach Bereichen gesucht, in denen eine Reihe von 7 CpG in Folge aberrant methyliert vorlagen. Die Festlegung auf 7 konsekutiv aberrant methylierte Loci erfolgte empirisch. Es wurden zunächst 3-in-Folge, 7-in-Folge und 12-in-Folge aberrant methylierte Blöcke zusammengestellt. Dabei zeigten sich 3 aberrant methylierte CpG-Loci in Folge sehr häufig, sodass erneut das Problem entstand, zu viele einzel-

ne Werte zu überschauen. Das Gegenteil war bei 12 aberrant methylierten CpG-Loci der Fall, denn hier gab es sehr wenige Ergebnisse, sodass die Gefahr bestand, individuelle Auffälligkeiten mit kürzerem aberrantem DNA-Methylierungsmuster zu übersehen. Schließlich wurde also mit 7 aberrant methylierten CpG-Loci in Folge weitergearbeitet. Es besteht bei diesen Berechnungen die Möglichkeit, dass individuelle aberrant methylierte Bereiche, die weniger als 7 CpG-Loci ausmachen, hierbei übersehen wurden. Einzelne Gene werden auf dem Infinium *HumanMethylation450 BeadChip* mit deutlich weniger als 7 CpG abgebildet, das heißt, eine aberrante DNA-Methylierung eines einzelnen Gens wäre auf diesem Weg übersehen worden. Ebenso könnte es passieren, dass ein Patient mit einer aberranten DNA-Methylierung nicht auffällt, weil die Differenz zum Mittelwert der Kontrollen kleiner als 20% ist. Einen Hinweis darauf ergab sich bei der diagnostizierten Imprintingstörung in *IGF2*, denn diese fiel in der patientenbezogenen Analyse nicht auf, sondern nur in der Heatmap-Darstellung der Imprinting-Störungen (Abbildung 8), da keine aberrante DNA-Methylierung von 20% im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollen über 7 CpG in Folge vorlag. Da allerdings 485.577 CpG-Loci analysiert wurden, war eine spezifischere Betrachtung jeder einzelnen Stelle nicht möglich. Aufgrund der Tatsache, dass die Bedingungen der aberranten DNA-Methylierung sehr stringent gefasst wurden, können die erzielten Ergebnisse in einem engen Zusammenhang mit der Ausprägung einer Intelligenzstörung betrachtet werden.

Kleingruppenanalyse:

Bei der patientenbezogenen Analyse wurden zunächst die zehn am häufigsten in der Patientengruppe vorkommenden 7-in-Folge aberrant methylierten CpG näher betrachtet, weil dadurch statistische Signifikanz für ein neues Kandidatengen erreicht werden sollte ($p > 0,05$) (siehe Tabelle 2). Hierbei zeigten sich Bereiche in den Genen *PAX8* (Chromosom 2), *HOXA5* (Chromosom 7) und *KCNAB3* (Chromosom 17) gehäuft aberrant methyliert. Die aberrante DNA-Methylierung um 20% im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollen zeigte sich entweder nur bei Patienten oder aber einzelne Kontrollen zeigten bei diagnostizierter Hypomethylierung einzelner Patienten eine Hypermethylierung (wiederum im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollen). Es war allerdings nicht möglich, ein neues, statistisch signifikantes Kandidatengen zu benennen (*PAX8*: $p=0,3411$, *HOXA5*: $p=0,2008$, *KCNAB3*: $p=0,3411$; Fisher-Test). Eine Ursache hierfür könnte die vergleichsweise relativ kleine Kontrollgruppe sein, die sich aus 19 Kindern zusammensetzt, denn bei größeren Stichproben kann man kleinere p-Werte und damit statistisch signifikantere Werte erhalten (Bender und Lange 2007). Eine weitere

Ursache könnte die insgesamt inhomogene Patientengruppe sein, die sich aus vielen verschiedenen Phänotypen zusammensetzt. Vielleicht wäre es möglich, bei der Analyse des DNA-Methylierungsmusters von Patienten mit ähnlicherer Symptomatik ein neues Kandidatengen für eine Intelligenzstörung zu benennen. Bei der Betrachtung der Boxplot-Darstellungen (Abbildungen 12 bis 14) fällt auf, dass die aberrante DNA-Methylierung zum Mittelwert und nicht zum maximalen beziehungsweise minimalen DNA-Methylierungswert der Kontrollen berechnet wurde, denn meist liegt auch eine Kontrollperson nahe dem DNA-Methylierungswert des Patienten mit der aberranten DNA-Methylierung. Die Tatsache, dass auch Kontrollpersonen aberrante DNA-Methylierungswerte im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollgruppe zeigen, schränkt das Ergebnis der patientenbezogenen Analysen ein. Es kann deshalb noch kein Rückschluss von dem DNA-Methylierungsmuster auf die Ausprägung einer Intelligenzstörung gezogen werden. Um einen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der DNA-Methylierungsauffälligkeiten in *PAX8*, *HOXA5* und *KCNAB3* herzustellen, wurde eine Stichwortsuche in der Online-Datenbank Pubmed (In: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) durchgeführt, indem der jeweilige Gen-Name sowie eins der Stichworte ‚*mental retardation*‘ oder ‚*intellectual disability*‘ eingegeben wurde. Außerdem wurde mit Hilfe des Online-Katalogs OMIM für menschliche Gene und genetische Erkrankungen (In: <http://www.omim.org/>) recherchiert, ob es einen Zusammenhang zwischen einem der Gene und der Ausprägung einer Intelligenzstörung gibt. Der einzige Treffer bei der Suche ergab sich in beiden Datenbanken bei *PAX8*, denn hier besteht die Verbindung zu kongenitaler Hypothyreose, da *PAX8* als Transkriptionsfaktor in die Schilddrüsenentwicklung involviert ist (LaFranchi 1999; Hüffmeier et al. 2007; Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 218700: {30.12.2013}: World Wide Web URL: <http://omim.org/>). Da allerdings in Deutschland im Neugeborenen-screening auf Hypothyreose getestet wird, ist diese als Ursache für die Intelligenzstörung bei mehreren Patienten sehr unwahrscheinlich. Für *HOXA5* und *KCNAB3* konnte keine Verbindung zu einer Intelligenzstörung gefunden werden. Es bleibt also unklar, warum diese drei Gene, *PAX8*, *HOXA5* und *KCNAB3*, bei jeweils mehreren Patienten eine auffällige DNA-Methylierung zeigten.

Individuelle Betrachtung von Patienten:

Für die Betrachtung der einzelnen Patienten wurde für jeden Patienten eine individuelle Liste mit allen aberranten DNA-Methylierungsblöcken (ausgenommen der bereits in der Kleingruppenanalyse gefundenen Blöcke) angefertigt und jeweils überprüft, ob auch eine Person

aus der Kontrollgruppe an derselben Stelle eine Auffälligkeit zeigte. Hier ergab sich ein inhomogenes Verteilungsmuster, da ein Patient 19 dieser Blöcke aufwies (Patient 62) und zwei Patienten keinen solchen Block zeigten (Patienten 21 und 72). Ein ähnliches Bild wiesen die Kontrollen auf, hier zeigten die Kontrollen 8 und 11 keinen Block aberranter DNA-Methylierung und Kontrolle 10 hatte 15 aberrant methylierte Blöcke. Daraus ergibt sich, dass nicht allein das Vorhandensein aberrant methylierter Blöcke die Erklärung für die Ausprägung einer Intelligenzstörung sein kann. Es wurde versucht, einen Zusammenhang zwischen den Lokalisationen der aberranten DNA-Methylierung bei den einzelnen Patienten und dem Phänotyp einer Intelligenzstörung herzustellen. Mit Ausnahme der Auffälligkeit in *MEG3* (siehe oben) konnte aber kein Zusammenhang entdeckt werden. Auffällige DNA-Methylierungswerte ergaben sich in *NLRP2* (Chromosom 19) und *RNF39* (Chromosom 6), da hier jeweils mehrere Patienten, aber keine Kontrollen Hypermethylierungsblöcke zeigten. Die aberrante DNA-Methylierung in *NLRP2* war bei zwei Patienten zu finden, die Hypermethylierung in *RNF39* fiel bei 6 Patienten auf. Bei allen drei dargestellten Patienten (Patienten 22 und 71 für *NLRP2*, Patient 16 für *RNF39*, siehe Abbildungen 15 und 16) zeigte sich eine konstante DNA-Hypermethylierung über alle 7 CpG in Folge, die über dem maximalen Methylierungswert der Kontrollen liegt. Durch die Tatsache, dass bei mehreren Patienten mit Intelligenzstörung diese Lokalisationen hypermethyliert vorliegen, aber keine Kontrolle betroffen ist, ergibt sich ein Hinweis auf einen Zusammenhang mit dem Phänotyp. Wie dieser aussehen könnte, bleibt allerdings unklar. Ein Hinweis darauf ergibt sich vielleicht bei der Betrachtung der Funktion von *RNF39*, da das homologe Gen bei der Ratte eine mögliche Rolle bei der frühen synaptischen Plastizität spielt (Matsuo et al. 2001). Es gibt aber noch keine Arbeit zu dem Zusammenhang von einer DNA-Methylierungsstörung in *RNF39* und dem Vorliegen einer Intelligenzstörung.

Ein weiterer Hinweis ergibt sich aus einer Studie von Meyer et al. aus dem Jahr 2009, in der bei einer Mutter von zwei Kindern mit Beckwith-Wiedemann Syndrom eine homozygote *frameshift*-Mutation in *NLRP2* gefunden wurde und somit *NLRP2* in einen Zusammenhang bringt mit der Etablierung und/oder der Aufrechterhaltung der genomischen Prägung. Es wäre möglicherweise lohnenswert, den Zusammenhang von *NLRP2* und der Entwicklung einer Störung der geistigen Entwicklung weiter zu erforschen.

4.3 Fazit

Das Ziel dieser Arbeit war es, genomweite DNA-Methylierungsanalysen bei Patienten mit Intelligenzstörungen durchzuführen, um zu untersuchen, ob Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters für die Entwicklung einer Intelligenzstörung ursächlich sein können. Die zuvor gesetzten Ziele wurden, mit Ausnahme der Benennung eines neuen, statistisch signifikanten Kandidatengens, erreicht.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Differenzierung zwischen dem DNA-Methylierungsmuster von Patienten mit Intelligenzstörungen und gesunden Kontrollen im peripheren Blut anhand von 254 differentiell methylierten CpG-Loci.
- Analyse der individuellen DNA-Methylierungsmuster jedes einzelnen Patienten: Hierbei wurden Blöcke aberranter DNA-Methylierung sowohl in Kleingruppen als auch bei einzelnen Patienten gefunden.
- Diagnose von zwei Imprinting-Störungen, auf die die klinische Symptomatik der Patienten nicht eindeutig schließen ließ (zum einen in *MEG3*, zum anderen in *IGF2*).
- Diagnose einer Imprinting-Störung in *FAM50B*, welche bisher noch nicht in Zusammenhang mit einer Störung der geistigen Entwicklung beschrieben wurde.

4.4 Ausblick

In dieser Studie hat sich gezeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen dem DNA-Methylierungsmuster im peripheren Blut und einer Intelligenzstörung gibt. Die Untersuchungen erfolgten an peripherem Blut, weil dies ein Untersuchungsmaterial ist, an das man mit wenig Aufwand und geringen Kosten gelangen kann.

In unserer Studie wurden über 480.000 CpG-Loci analysiert, hiermit wurde schon ein großer Bereich des Genoms abgedeckt. Seit neuestem ist es aber auch möglich, mittels des sogenannten *Next-generation Sequencing* methyloweite Analysen zu machen (Marcucci et al. 2013; Mensaert et al. 2014). Dieses bedarf dann keiner Selektion der zu analysierenden Loci mehr und könnte zu neuen, nicht erwarteten Ergebnissen führen.

In einem auf dieser Studie basierendem Folge-Projekt könnte man als Einschlusskriterien der Patientengruppe eine Intelligenzstörung sowie zum Beispiel ausschließlich eine kindliche Epilepsie benennen, sodass der Phänotyp der Patientengruppe insgesamt homogener wäre und möglicherweise die Suche nach einem Kandidatengen erleichtern würde. Auch die Vergrößerung der Kollektive von Patienten- und Kontrollgruppe wäre zur weiteren Erforschung eines statistisch signifikanten Kandidatengens erstrebenswert.

Es hat sich aber auch gezeigt, dass bei der Symptomatik einer Intelligenzstörung an das Vorliegen eines Imprinting-Syndroms gedacht werden muss. So wäre es wünschenswert, Patienten mit unklarer Ätiologie der Intelligenzstörung auf das Vorliegen eines Imprinting-Syndroms zu untersuchen. Vielleicht wird es bald möglich sein, in nur einem diagnostischen Schritt auf das allgemeine Vorliegen eines Imprinting-Syndroms zu testen, anstatt wie bisher anhand der Symptomatik des Patienten nur auf eines der Syndrome zu testen. Dies würde dazu führen, dass die erfolgreiche Diagnostik nicht mehr so abhängig von der klinischen Präsentation wäre.

In einer Untersuchung auf aberrante DNA-Methylierung neu identifizierter, geprägter Loci wurde eine Hypomethylierung in *FAM50B* entdeckt. Diese Ergebnisse sollten in einer größeren Patientengruppe verifiziert werden. Da die Funktion von *FAM50B* noch unbekannt ist, gibt es bisher noch keine kausale Verbindung zu einer Störung der geistigen Entwicklung. Wenn man die Funktion von *FAM50B* erforscht hat, wird es vielleicht möglich sein, eine Verbindung zu einer Störung der geistigen Entwicklung aufzuzeigen.

Im weiteren Verlauf der Erforschung von DNA-Methylierungsstörungen stellt sich auch die Frage nach Therapiemöglichkeiten. Es gibt bereits Medikamente, die das DNA-Methylierungsmuster verändern (Egger et al. 2004). Probleme bei der epigenetischen Thera-

pie sind aber unter anderem die noch unspezifische und nicht selektierbare Aktivierung von Genen in normalen Zellen und ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Karzinomen (Lu et al. 2006). Diese Bereiche werden in Zukunft weiter erforscht werden und können erste therapeutische Optionen bei aberranter DNA-Methylierung bieten.

5. Zusammenfassung

Die Ursache für eine Störung der geistigen Entwicklung bleibt bei bis zu 60% der Patienten unklar (Rauch et al. 2006). Neben der häufigsten Ursache, den numerischen Chromosomenaberrationen, sind aber auch Störungen im Bereich epigenetischer Mechanismen als Ursache für eine Intelligenzstörung bekannt. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit das genomweite DNA-Methylierungsmuster von Patienten mit Intelligenzstörungen mit altersgerecht entwickelten Kontrollen verglichen; die Analyse erfolgte mittels des Infinium *HumanMethylation450 BeadChip* bei insgesamt 81 Patienten und 19 Kontrollen anhand von Proben aus peripherem Blut.

Zunächst wurde eine Analyse zur Bestimmung differentiell methylierter Sequenzen zwischen Patienten- und Kontrollgruppe durchgeführt, dabei zeigten sich 254 CpG-Loci differentiell methyliert, wobei hier eine Häufung aberrant methylierter Gene im Bereich der Signalwege der Antigen-Präsentation und -Prozessierung festgestellt werden konnte. In der Literatur ergibt sich an dieser Stelle ein Hinweis auf einen Zusammenhang mit einer Intelligenzstörung, da die den oben genannten Signalwegen zugehörigen *HLA*-Gene eine wichtige Rolle in der Entwicklung sowie der Plastizität des zentralen Nervensystems spielen.

In einem nächsten Untersuchungsschritt wurden alle Patienten auf die bisher bekannten Imprinting-Syndrome untersucht. Es konnten zwei bekannte Imprintingstörungen diagnostiziert werden. Zum einen wurde bei einem Patienten eine Hypomethylierung in *MEG3* festgestellt, zum anderen wurde bei einem anderen Patienten eine Hypermethylierung in *IGF2* gefunden. In einer Untersuchung auf neu identifizierte geprägte Gene zeigte sich eine dritte Störung des Imprintingmusters mit einer Hypomethylierung in der DMR von *FAM50B*; dieser Locus ist bisher in der Literatur nicht mit einer Intelligenzstörung in Verbindung gebracht worden.

Zusätzlich zu den allgemeinen DNA-Methylierungsanalysen (alle Patienten versus alle Kontrollen) wurden patientenbezogene DNA-Methylierungsanalysen durchgeführt. Es wurde nach Bereichen aberranter DNA-Methylierung gesucht, die sich über einen CpG-Bereich von mindestens 7 CpG in Folge erstreckt (= aberrant methylierte Blöcke), wobei aberrant methyliert definiert wurde als DNA-Methylierungswert, der um mindestens 20% vom Mittelwert der Kontrollen abweicht. Die zehn aberrant methylierten Blöcke, die am häufigsten beobachtet wurden, wurden genauer analysiert. Dabei gelang es, drei mögliche Kandidatengene für Intelligenzstörungen zu benennen, und zwar *PAX8*, *HOXA5* und *KCNAB3*, wobei hier noch keine statistische Signifikanz gezeigt werden konnte.

Schließlich wurde für jeden Patienten einzeln eine Liste mit allen aberrant methylierten Blöcken zusammengestellt. Bei der Betrachtung des individuellen DNA-Methylierungsmusters jedes einzelnen Patienten zeigten jeweils mehrere Patienten Hypermethylierungen in *RNF39* und *NLRP2*.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es gelungen ist, anhand 254 differentiell methylierter CpG-Loci zwischen Patienten und Kontrollen zu unterscheiden, in der Patientengruppe drei Imprinting-Störungen zu diagnostizieren und neue mögliche Kandidatengene zu benennen.

Insgesamt hat sich gezeigt, dass es sowohl im Hinblick auf die Diagnostik von Imprinting-Störungen als auch im Hinblick auf Erklärungen für die Ätiologie der Intelligenzstörung lohnenswert ist, genomweite DNA-Methylierungsanalysen im peripheren Blut bei Patienten mit Störungen der geistigen Entwicklung durchzuführen.

6. Literaturverzeichnis

- Antequera, F., Bird, A. (1993): Number of cpg islands and genes in human and mouse. Proc Natl Acad Sci U S A, 90, 11995-11999.
- Amir, R.E., Van den Veyver, I.B., Wan, M., Tran, C.Q., Francke, U., Zoghbi, H.Y. (1999): Rett syndrome is caused by mutations in x-linked *mecp2*, encoding methyl-cpg-binding protein 2. Nat Genet, 23, 185-188.
- Bender, R., Lange, S. (2007): Was ist der p-Wert? Artikel Nr.7 der Statistik-Serie in der DMW. Dtsch Med Wochenschr, 132, e15-e16.
- 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. (2013): Frequency and characterization of dna methylation defects in children born sga. Eur J Hum Genet, 21, 838-843.
- Bernstein, B.E., Meissner, A., Lander, E.S. (2007): The mammalian epigenome. Cell, 128, 669-681.
- Bibikova, M., Barnes, B., Tsan, C., Ho, V., Klotzle, B., Le, J.M., Delano, D., Zhang, L., Schroth, G.P., Gunderson, K.L., Fan, J.B., Shen, R. (2011): High density dna methylation array with single cpg site resolution. Genomics, 98, 288-295.
- Bienvenu, T., Chelly, J. (2006): Molecular genetics of rett syndrome: when dna methylation goes unrecognized. Nature, 7, 415-426.
- Bird, A. (2002): Dna methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev, 16, 6-21.
- Burd, L., Vesley, B., Martsof, J.T., Kerbeshian, J. (1991): Prevalence study of rett syndrome in north dakota children. Am J Med Genet, 38, 565-568.
- Cedar, H., Bergman, Y. (2012): Programming of dna methylation patterns. Annu Rev Biochem, 81, 4.1-4.21.
- Collins, R.E., Northrop, J.P., Horton, J.R., Lee, D.Y., Zhang, X., Stallcup, M.R., Cheng, X. (2008): The ankyrin repeats of g9a and glp histone methyltransferases are mono- and dimethyllysine binding modules. Nature Structural & Molecular Biology, 15 (3), 245-250.
- Corriveau, R.A., Huh, G.S., Shatz, C.J. (1998): Regulation of class I mhc gene expression in the developing and mature cns by neural activity. Neuron, 21, 505-520.
- Corvin, A., Morris, D.W. (2014): Genome-wide association studies: findings at the major histocompatibility complex locus in psychosis. Biol Psychiatry, 75, 276-283.

-
- Court, F., Tayama, C., Romanelli, V., Martin-Trujillo, A., Iglesias-Platas, I., Okamura, K., Sugahara, N., Simón, C., Moore, H., Harness, J.V., Keirstead, H., Sanchez-Mut, J.V., Kaneki, E., Lapunzina, P., Soejima, H., Wake, N., Esteller, M., Ogata, T., Hata, K., Nakabayashi, K., Monk, D. (2014): Genome-wide parent-of-origin dna methylation analysis reveals the intricacies of human imprinting and suggests a germline methylation independent mechanism of establishment. *Genome Res*, 24,554-569.
- Dedeurwaerder, S., Defrance, M., Calonne, E., Denis, H., Sotiriou, C., Fuks, F. (2011): Evaluation of the Infinium methylation 450k technology. *Epigenomics*, 3 (6), 771-784.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., Jones, P.A. (2004): Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429, 457-463.
- Elmer B.M., McAllister, A.K. (2012): Major histocompatibility complex class I proteins in brain development and plasticity. *Trends Neurosci*, 35 (11), 660-670.
- Espada, J., Esteller, M. (2007): Epigenetic control of nuclear architecture. *Cell Mol Life Sci*, 64, 449-457.
- Feinberg, A.P., Cui, H., Ohlsson, R. (2002): Dna methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. *Cancer Biology*, 12, 389-398.
- Gibney, E.R., Nolan, C.M. (2010): Epigenetics and gene expression. *Heredity*, 105, 4-13.
- Gilissen, C., Hehir-Kwa, J.Y., Thung, D.T., van de Vorst, M., van Bon, B.W.M., Willemsen, M.H., Kwint, M., Janssen, I.M., Hoischen, A., Schenck, A., Leach, R., Klein, R., Te arle, R., Bo, T., Pfundt, R., Yntema, H.G., de Vries, B.B.A., Kleefstra, T., Brunner, H.G., Vissers, L.E.L.M., Veltman, J.A. (2014): Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature*, 511, 344-347.
- Goelz, S.E., Vogelstein, B., Hamilton, S.R., Feinberg, A.P. (1985): Hypomethylation of dna from benign and malignant human colon neoplasms. *Science*, 228, 187-190.
- Hagberg, B., Aicardi, J., Dias, K., Ramos, O. (1983): A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: rett's syndrome: report of 35 cases. *Ann Neurol*, 14 (4), 471-479.
- Holliday, R. (1987): The inheritance of epigenetic defects. *Science*, 238, 163-170.
- Hüffmeier, U., Tietze, H.-U., Rauch, A. (2007): Severe skeletal dysplasia caused by undiagnosed hypothyroidism. *Eur J Med Genet*, 50, 209-215.
- Ioannides, Y., Lokulo-Sodipe, K., Mackay, D.J.G., Davies, J.H., Temple, K. (2014): Temple syndrome: improving the recognition of an underdiagnosed chromosome 14 imprinting disorder: an analysis of 51 published cases. *J Med Genet*, 51, 495-501.
- Ishida, M., Moore, G.E. (2012): The role of imprinted genes in humans. *Mol Aspects Med*, 1-15.

-
- Jackson-Grusby, L., Beard, C., Possemato, R., Tudor, M., Fambrough, D., Csankovszki, G., Dausman, J., Lee, P., Wilson, C., Lander, E., Jaenisch, R. (2001): Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat Genet*, 27, 31-39.
- Jaenisch, R., Bird, A. (2003): Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat genet suppl*, 33, 245-254.
- Jirtle, R.L., Skinner, M.K. (2007): Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Genet*, 8, 253-262.
- Jones, P.A., Laird, P.W. (1999): Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*, 21, 163-167.
- Jost, E., Lin, Q., Weidner, C.L., Wilop, S., Hoffmann, M., Walenda, T., Schemionek, M., Herrmann, O., Zenke, M., Brümmendorf, T.H., Koschmieder, S., Wagner, W. (2013): Epimutations mimic genomic mutations of *dnmt3a* in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 1-8.
- Kaneda, M. (2011): Genomic imprinting in mammal epigenetic parental memories. *Differentiation*, 82, 51-56.
- Klamut, H.J., Bosnoyan-Collins, L.O., Worton, R.G., Ray, P.N., Davis, H.L. (1996): Identification of a transcriptional enhancer within muscle intron 1 of the human dystrophin gene. *Hum Mol Genet*, 5 (10), 1599-1606.
- Kleefstra, T., Brunner, H.G., Amiel, J., Oudakker, A.R., Nillesen, W.M., Magee, A., Geneviève, D., Cormier-Daire, V., van Esch, H., Fryns, J.-P., Hamel, B.C.J., Sistermanns, E.A., de Vries, B.B.A., van Bokhoven, H. (2006): Loss-of-function mutations in euchromatin histone methyl transferase1 (*ehmt1*) cause the 9q34 subtelomeric deletion syndrome. *Am J Human Genet*, 79,370-377.
- Kleefstra, T., van Zeist-Stams, W.A., Nillesen, W.M., Cormier-Daire, V., Houge, G., Foulds, N., van Dooren, M., Willemsen, M.H., Pfundt, R., Turner, A., Wilson, M., McGaughan, J., Rauch, A., Zenker, M., Adam, M.P., Innes, M., Davies, C., González-Meneses López, A., Casalone, R., Weber, A., Brueton, L.A., Delicado Navarro, A., Palomares Bralo, M., Venselaar, H., Stegmann, S.P.A., Yntema, H.G., van Bokhoven, H., Brunner, H.G. (2009): Further clinical and molecular delineation of the 9q subtelomeric deletion syndrome supports a major contribution of *ehmt1* haploinsufficiency to the core phenotype. *J Med Genet*, 46, 598-606.
- Kleefstra, T., Kramer, J.M., Neveling, K., Willemsen, M.H., Koemans, T.S., Vissers, L.E.L.M., Wissink-Lindhout, W., Fenckova, M., van den Akker, W.M.R., Kasri, N.N., Nillesen, W.M., Prescott, T., Clark, R.D., Devriendt, K., van Reeuwijk, J., de Brouwer, A.P.M., Gilissen, C., Zhou, H., Brunner, H.G., Veltman, J.A., Schenck, A., van Bokhoven, H. (2012): Disruption of an *ehmt1*-associated chromatin-modification module causes intellectual disability. *Am J Human Genet*, 91, 73-82.

-
- Kolarova, J., Tangen, I., Bens, S., Gillessen-Kaesbach, G., Gutwein, J., Kautza, M., Ryzanicz, M., Stephanie, U., Siebert, R., Ammerpohl, O., Caliebe, A. (2015): Array-based dna methylation analysis in individuals with developmental delay/intellectual disability and normal molecular karyotype, *Eur J Med Genet*, 58 (8), 419-425.
- Kotzot, D., Utermann, G. (2005): Uniparental disomy (upd) other than 15: phenotypes and bibliography updated. *Am J Med Genet*, 136A, 287-305.
- Kuan, P.F., Wang, S., Zhou, X., Chu, H. (2010): A statistical framework for illumina dna methylation arrays. *Bioinformatics*, 26 (22), 2849-2855.
- LaFranchi, S. (1999): Congenital hypothyroidism: etiologies, diagnosis, and management. *Thyroid*, 9 (7), 735-740.
- Lenhard, W., Breitenbach, E., Ebert, H., Schindelbauer-Deutscher, H.J., Henn, W. (2005): Psychological benefit of diagnostic certainty for mothers of children with disabilities: lessons from down syndrome. *Am J Med Genet*, 133A, 170-175.
- Lewis, J.D., Meehan, R.R., Henzel, W.J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F., Bird, A. (1992): Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated dna. *Cell*, 69, 905-914.
- Li, E., Beard, C., Jaenisch, R. (1993): Role for dna methylation in genomic imprinting. *Nature*, 366, 362-365.
- Lu, Q., Qiu, X., Hu, N., Wen, H., Su, Y., Richardson, B.C. (2006): Epigenetics, disease, and therapeutic interventions. *Ageing Res Rev*, 5, 449-467.
- Mackay, D.J.G., Callaway, J.L.A., Marks, S.M., White, H.E., Acerini C.L., Boonen, S.E., Dayanikli, P., Firth, H.V., Goodship, J.A., Haemers, A.P., Hahneman, J.M.D., Kordonouri, O., Masoud, A.F., Oestergaard, E., Storr, J., Ellard, S., Hattersley, A.T., Robinson, D.O., Temple, K. (2008): Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in *ZFP57*. *Nat Genet* 40 (8), 949-951.
- Maksimovic, J., Gordon, L., Oshlack, A. (2012): Swan: subset-quantile within array normalization for illumina infinium humanMethylation450 beadchips. *Genome Biol*, 13, 1-12.
- Marcucci, G., Yan, P., Maharry, K., Frankhouser, D., Nicolet, D., Metzeler, K.H., Kohlschmidt, J., Mrózek, K., Wu, Y.-Z., Bucci, D., Curfman, J.P., Whitman, S.P., Einfeld, A-K., Mendler, J.H., Schwind, S., Becker, H., Bär, C., Carroll, A.J., Baer, M.R., Wetzler, M., Carter, T.H., Powell, B.L., Kolitz, J.E., Byrd, J.C., Plass, C., Garzon, R., Caligiuri, M.A., Stone, R.M., Volinia, S., Bundschuh, R., Bloomfield, C.D. (2013): Epigenetics meets genetics in acute myeloid leukemia: clinical impact of a novel seven-gene score. *J Clin Oncol*, 31, 1-9.

-
- Martín-Subero, J.I., Ammerpohl, O., Bibikova, M., Wickham-Garcia, E., Agirre, X., Alvarez, S., Brüggemann M., Bug, S., Calasanz M.J., Deckert, M., Dreyling, M., Du, M.Q., Dürig, J., Dyer, M.J.S., Fan, J.B., Gesk, S., Hansmann, M.L., Harder, L., Hartmann, S., Klapper, W., Küppers, R., Montesinos-Rongen, M., Nagel, I., Pott, C., Richter, J., Román-Gómez, J., Seifert, M., Stein, H., Suela, J., Trümper L., Vater, I., Prosper, F., Haferlach, C., Cigudosa, J.C., Siebert, R. (2009a): A comprehensive microarray-based dna methylation study of 367 hematological neoplasms. *PLoSOne*, 4(9):e6986, 1-11.
- Martín-Subero, J.I., Kreuz, M., Bibikova, M., Bentink, S., Ammerpohl, O., Wickham-Garcia E., Rosolowski, M., Richter, J., Lopez-Serra, L., Ballestar, E., Berger, H., Agirre, X., Bernd, H.W., Calvanese, V., Cogliatti, S.B., Drexler, H.G., Fan, J.B., Fraga, M.F., Hansmann, M.L., Hummel, M., Klapper, W. Korn, B. Küppers, R., MacLeod R.A.F., Möller, P., Ott, G., Pott, C., Prosper, F., Rosenwald, A., Schwaenen, C., Schübeler, D., Seifert, M., Stürzenhofecker, B. Weber, M., Wessendorf, S, Loeffler, M., Trümper, L., Stein, H., Spang, R., Esteller, M., Barker, D., Hasenclever, D., Siebert, R. (2009b): New insights into the biology and origin of mature aggressive b-cell lymphomas by combined epigenomic, genomic, and transcriptional profiling. *Blood*, 113(11), 2488-2497.
- Martino, D., Loke, Y.J., Gordon, L., Ollikainen, M., Cruickshank, M.N., Saffery, R., Craig, J.M. (2013): Longitudinal, genome-scale analysis of dna methylation in twins from birth to 18 months of age reveals rapid epigenetic change in early life and pair-specific effects of discordance. *Genome Biol*, 14, 1-14.
- Masliyah, E., Dumaop, W., Galasko, D., Desplats, P. (2013): Distinctive patterns of dna methylation associated with parkinson disease. Identification of concordant epigenetic changes in brain and peripheral blood leukocytes. *Epigenetics*, 8 (10), 1030-1038.
- Matsuo, R., Asada, A., Fujitani, K., Inokuchi, K. (2001): *Lirf*, a gene induced during hippocampal long-term potentiation as an immediate-early gene, encodes a novel ring finger protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 289 (2), 479-484.
- Mensaert, K., Denil, S., Trooskens, G., Van Criekinge, W., Thas, O., De Meyer, T. (2014): Next-generation technologies and data analytical approaches for epigenomics. *Environ Mol Mutagen*, 55, 155-170.
- Meyer, E., Lim, D., Pasha, S., Tee, L.J., Rahman, F., Yates, J.R.W., Woods, C.G., Reik, W., Maher, E.R. (2009): Germline mutation in *nlrp2* (*nalp2*) in a familial imprinting disorder (beckwith-wiedemann syndrome). *PLoS Genetics*, 5 (3), 1-5.
- Miyoshi, N., Wagatsuma, H., Wakana, S., Shiroishi, T., Nomura, M., Aisaka, K., Kohda, T., Surani, M.A., Kaneko-Ishino, T., Ishino, F. (2000): Identification of an imprinted gene, *meg3/gtl2* and its human homologue *meg3*, first mapped on mouse distal chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genes Cells*, 5, 211-220.
- Miyoshi, N., Barton, S.C., Kaneda, M., Hajkova, P., Surani, M.A. (2006): The continuing quest to comprehend genomic imprinting. *Cytogenet Genome Res*, 113, 6-11.

-
- Nakabayashi, K., Trujillo, A.M., Tayama, C., Camprubi, C., Yoshida, W., Lapunzina, P., Sanchez, A., Soejima, H., Aburatani, H., Nagae, G., Ogata, T., Hata, K., Monk, D. (2011): Methylation screening of reciprocal genome-wide upds identifies novel human-specific imprinted genes. *Hum Mol Genet*, 20 (16), 3188-3197.
- Naveh-Many, T., Cedar, H. (1981): Active gene sequences are undermethylated. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78 (7), 4246-4250.
- Newell-Price, J., Clark, A.J.L., King, P. (2000): Dna methylation and silencing of gene expression. *TEM*, 11(4), 142-148.
- Ojeda, S.R., Lomniczi, A., Sandau, U., Matagne, V. (2010): New concepts on the control of the onset of puberty. *Endocr Dev.*, 17, 44–51.
- Polder, J.J., Meerding, W.J., Koopmanschap, M.A., Bonneux, L., van der Maas, P.J. (1998): The cost of sickness in the netherlands in 1994. *Ned Tijdschr Geneesk*, 142 (28), 1607-1611.
- Polychronakos, C., Kukuvtis, A. (2002): Parental genomic imprinting in endocrinopathies. *Eur J Endocrinol*, 147, 561-569.
- Poole, R.L., Baple, E., Crolla, J.A., Temple, I.K., Mackay, D.J.G. (2010): Investigation of 90 patients referred for molecular cytogenetic analysis using acgh uncovers previously unsuspected anomalies of imprinting. *Am J Med Genet Part A*, 152A (8), 1990-1993.
- Poole, R.L., Docherty, L.E., Al Sayegh, A., Caliebe, A., Turner, C., Baple, E., Wakeling, E., Harrison, L., Lehmann, A., Temple, I.K., Mackay, D.J.G. and on behalf of the International Clinical Imprinting Consortium (2013): Targeted methylation testing of a patient cohort broadens the epigenetic and clinical description of imprinting disorders. *Am J Med Genet Part A*, 161A, 2174-2182.
- Rauch, A., Hoyer, J., Guth, S., Zweier, C., Kraus, C., Becker, C., Zenker M., Hüffmeier U., Thiel, C., Rüschemdorf, F., Nürnberg, P., Reis, A., Trautmann, U. (2006): Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet, Part A*, 140A, 2063-2074.
- Rauch, A. (2008): Molekulare Karyotypisierung in der klinischen Diagnostik. *medgen*, 20, 386-394.
- Reik, W., Maher, E.R. (1997): Imprinting in clusters: lessons from beckwith-wiedemann syndrome. *Trends Genet*, 13 (8), 330-334.
- Reik, W., Walter, J. (2001): Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature*, 2, 21-32.
- Reish, O., Lerer, I., Amiel, A., Heyman, E., Herman, A., Dolfín, T., Abeliovich, D. (2002): Wiedemann-Beckwith Syndrome: Further prenatal characterization of the condition. *Am J Med Genet*, 107, 209-213.
- Robertson, K.D. (2005): Dna methylation and human disease. *Nature*, 6, 597-610.

-
- Ropers, H.H., Hamel, B.C.J. (2005): X-linked mental retardation. *Nat Genet*, 6, 46-57.
- Sandoval, J., Heyn, H., Moran, S., Serra-Musach, J., Pujana, M.A., Bibikova, M., Esteller, M. (2011): Validation of a dna methylation microarray for 450,000 cpg sites in the human genome. *Epigenetics*, 6 (6), 692-702.
- Sedlacek, Z., Münstermann, E., Dhorne-Pollet, S., Otto, C., Bock, D., Schütz, G., Poustka, A. (1999): Human and Mouse *xap-5* and *xap-5-like (x5l)* genes: identification of an ancient functional retroposon differentially expressed in testis. *Genomics*, 61, 125-132.
- Schütt, C., Bröker, B. (2009): *Grundwissen Immunologie*. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. a) Seite 246, b) Seite 59, c) Seite 24, d) Seiten 25,26.
- Scott, R.H., Douglas, J., Baskcomb, L., Nygren, A.O., Birch, J.M., Cole, T.R., Cormier-Daire, V., Eastwood, D.M., Garcia-Minaur, S., Lupunzina, P., Tatton-Brown, K., Blik, J., Maher, E.R., Rahman, N. (2008): Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (ms-mlpa) robustly detects and distinguishes 11p15 abnormalities associated with overgrowth and growth retardation. *J Med Genet*, 45, 106-113.
- Shatz, C.J. (2009): MHC Class I: An unexpected role in neuronal plasticity. *Neuron*, 64, 40-45.
- Sirianni, N., Naidu, S., Pereira, J., Pillotto, R.F., Hoffmann, E.P. (1998): Rett syndrome: confirmation of X-linked dominant inheritance, and localization of the gene to xq28. *Am J Hum Genet*, 63, 1552-1558.
- Smith, F.M., Garfield, A.S., Ward, A. (2006): Regulation of growth and metabolism by imprinted genes. *Cytogenet Genome Res*, 113, 279-291.
- Stewart, D.R., Huang, A., Faravelli, F., Anderlid, B.-M., Medne, L., Ciprero, K., Kaur, M., Rossi, E., Tenconi, R., Nordenskjöld, M., Gripp, K.W., Nicholson, L., Meschino, W.S., Capua, E., Quarrell, O.W.J., Flint, J., Irons, M., Giampietro, P.F., Schowalter, D.B., Zaleski, C.A., Malacarne, M., Zackai, E.H., Spinner, N.B., Krantz, I.D. (2004): Subtelomeric deletions of chromosome 9q: a novel microdeletion syndrome. *Am J Med Genet*, 128A, 340-351.
- Sutton, V.R., Shaffer, L.G. (2000): Search for imprinted regions on chromosom 14: comparison of maternal and paternal upd cases with cases of chromosome 14 deletion. *Am J Med Genet*, 93, 381-387.
- Szyf, M. (2009): The early life environment and the epigenome. *Biochim Biophys Acta*, 878-885.
- Tachibana, M., Ueda, J., Fukuda, M., Takeda, N., Ohta, T., Iwanari, H., Sakihama, T., Kodoma, T., Hamakubo, T., Shinkai, Y. (2005): Histone methyltransferases g9a and glp form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at h3-k9. *Genes Dev*, 19, 815-826.

-
- Temple, I.K., Shrubbs, V., Lever, M., Bullmann, H., Mackay, D.J.G. (2007): Isolated imprinting mutation of the *dlk1/gtl2* locus associated with a clinical presentation of maternal uniparental disomy of chromosome 14. *J Med Genet*, 44, 637-640.
- Thirlwell, C., Eymard, M., Feber, A., Teschendorff, A., Pearce, K., Lechner, M., Widschwendter, M., Beck, S. (2010): Genome-wide dna methylation analysis of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue using the illumina infinium humanMethylation27 beadchip. *Methods* 52, 248-254.
- Tzschach, A., Ropers, H.-H. (2007): Genetik der mentalen Retardierung. *Dtsch Ärztebl*, 104(20), A1400-1405.
- van Bokhoven, H. (2011): Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annu Rev Genet*, 45, 81-104.
- Wade, P.A. (2001): Methyl cpg binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation. *Oncogene*, 20, 3166-3173.
- Weksberg, R., Squire, J.A. (1996): Molecular biology of beckwith-wiedemann syndrome. *Med Pediatr Oncol*, 27, 462-469.
- 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*, 12 (1), R61-R68.
- Wigler, M.H. (1981): The inheritance of methylation patterns in vertebrates. *Cell*, 24, 285-286.
- Yoder, J.A., Walsh, C.P., Bestor, T.H. (1997): Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *TIG*, 13 (8), 335-340.
- Zaina, S., Lund, G. (2012): Integrating genomic and epigenomic information: a promising strategy for identifying functional dna variants of human disease. *Clin Genet*, 81, 334-340.
- Zhang, A., Skaar, D.A., Li, Y., Huang, D., Price, T.M., Murphy, S.K., Jirtle, R.L. (2011): Novel retrotransposed imprinted locus identified at human 6p25. *Nucleic Acids Res*, 39 (13), 5388-5400.
- Zilbermann, D., Henikoff S. (2007): Genome-wide analysis of dna methylation patterns. *Development*, 134, 3959-3965.

Internetquellen:

- <http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/> - aus: Eden E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D., Yakhini, Z. (2009): GORilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. BMC Bioinformatics, 10(48), 1-7 - (zuletzt aufgerufen am 26.10.2015).
- <http://www.dimdi.de/static/de/klassi/icd-10-gm/kodesuche/onlinefassungen/htmlgm2014/block-f70-f79.htm> -aus: Dimdi Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information (2013): „Dimdi-Medizinwissen“- (zuletzt aufgerufen am 26.10.2015).
- <http://www.geneimprint.com/site/genes-by-species>; aus: Geneimprint, Jirtle, R.L. (2012): “geneimprint” (zuletzt aufgerufen am 26.10.2015).
- http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_hm450_data_analysis_optimization.pdf; aus: Illumina (2012): “Human methylation450 beadchip achieves breadth of coverage using two Infinium chemistries.” (zuletzt aufgerufen am 26.10.2015).
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>; aus: National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine (2001) “Pubmed” (zuletzt aufgerufen am: 26.10.2015).
- <http://genome.ucsc.edu/>; aus: UCSC Genome Browser: Kent, W.J., Sugnet, C.W., Furey, T.S., Roskin, K.M., Pringle, T.H., Zahler, A.M., Haussler, D. (2002),” The human genome browser at UCSC”, Genome Res, 12(6), 996-1006. (zuletzt aufgerufen am 26.10.2015).
- <http://www.omim.org/>; aus: Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD). (zuletzt aufgerufen am 26.10.2015).

7. Anhang

7.1. Übersichtstabelle der klinischen Daten der Patientengruppe

	männlich	weiblich
Anzahl	46	36
Alter (bei Probeneingang)	7 Monate bis-17 Jahre (Median 5 Jahre)	4 Monate bis 25 Jahre (Median 7,5 Jahre)
Geburtsgröße		
Normal	16	14
</= 3. Perzentile	2	3
>/= 97. Perzentile	0	2
Keine Daten	28	17
Körpergröße (postnatal)		
Normal	14	18
Kleinwuchs	11	8
Großwuchs	1	0
Keine Daten	20	10
Kopfumfang		
Normal	8	13
Mikrocephalie	9	6
Makrocephalie	2	1
Keine Daten	27	16
Adipositas		
vorhanden	4	4
Normalgewicht	13	17
Keine Daten	29	15
Muskuläre Hypotonie		
vorhanden	10	14
Keine Daten/ nicht beschrieben	36	22
Epilepsie		
vorhanden	20	9
EEG abnormal, keine Krämpfe	1	2
Keine Daten	25	25
Malformationen		
vorhanden	6	6
Keine Daten/ nicht beschrieben	40	30

Tabelle 3: Übersichtstabelle der Patientendaten (Kolarova et al. 2015).

7.2 Übersichtstabelle der 254 differentiell methylierten CpG-Loci

NR	TargetID	UCSC_REFGENE_NAME	CHR	MAPINFO
1	cg00030117	STEAP3	2	119980249
2	cg00257789	TTC15	2	3451506
3	cg00366603	NOTCH4	6	32186049
4	cg00579921	HLA-DRB5	6	32489991
5	cg00597445	CRMP1	4	5888193
6	cg00611789	CMYA5	5	78985432
7	cg00704664	CDH4	20	60500578
8	cg00729708	LASS3	15	101084442
9	cg00814218	SLC25A21	14	37445440
10	cg00861214	CRIL	1	207849914
11	cg00990380		6	28601477
12	cg01055691	GAP43;GAP43	3	115376349
13	cg01127608	LMX1B	9	129377854
14	cg01156747		7	120659
15	cg01201512	NINJ2	12	740338
16	cg01223071		11	86472904
17	cg01236565		20	11869467
18	cg01266264		2	45538072
19	cg01412404		3	14289162
20	cg01462799	UPF1	19	18959208
21	cg01463139	OR10K1	1	158435277
22	cg01543583	C14orf149	14	59947673
23	cg01552920	MYADML2	17	79905236
24	cg02100397		19	646890
25	cg02363653	RPTOR	17	78815421
26	cg02502145	SOS1	2	39319447
27	cg02533724		10	130279912
28	cg02564175		16	57333902
29	cg02658043	NRBP2	8	144917532
30	cg02819655	PDE11A	2	178853377
31	cg02890235		19	55735946
32	cg03088219	GPM6A	4	176711190
33	cg03119308	RBM28	7	127950724
34	cg03126739	RAET1E	6	150211725
35	cg03407524	FASN	17	80043349
36	cg03433033	ACADM	1	76189801

37	cg03635532	FCGBP	19	40376883
38	cg03830006	ENPP7	17	77707066
39	cg04033559	PDK1	2	173461819
40	cg04131969	MYADML	2	33951647
41	cg04145681	SFTA2	6	30899162
42	cg04165337		8	697377
43	cg04194432		10	134876495
44	cg04520693		13	50425353
45	cg04533751		6	168491686
46	cg04657146	HOOK2	19	12876947
47	cg04683516	AKR1C2	10	5047487
48	cg04798314	SMYD3	1	246668601
49	cg04990378	C20orf166;MIR133A2	20	61160996
50	cg05126514	BSN	3	49697458
51	cg05134736		12	378771
52	cg05308495	CACNG6	19	54515169
53	cg05340866	CNTNAP2	7	148032668
54	cg05393861	ITIH3	3	52828628
55	cg05455372	LOC168474	7	64314295
56	cg05712748		1	43472312
57	cg05818501	ADARB2	10	1451648
58	cg05837990		7	105596483
59	cg05848894		13	110640814
60	cg06051619	DIP2C	10	593275
61	cg06060522		20	44782039
62	cg06193597		2	241896910
63	cg06293782	HLA-DQA2	6	32713188
64	cg06417478	HOOK2	19	12876846
65	cg06703343	APOL3	22	36563048
66	cg06711418	MT2A	16	56643342
67	cg07068956	ZAN	7	100330872
68	cg07180897	HLA-DQB2	6	32729130
69	cg07183970		12	34457254
70	cg07240846	CAMK1D	10	12438782
71	cg07568841	ZNRF2	7	30362781
72	cg07618759	COL4A2	13	111115558
73	cg07703391	BMP8B;PPIE	1	40226045
74	cg07711085	NKAIN4	20	61877875
75	cg07732037	MPHOSPH9	12	123707827

76	cg07796016	LCE1C	1	152779584
77	cg07909498		4	79627477
78	cg08052546		7	50341210
79	cg08146708		1	167393634
80	cg08268047	FMO2	1	171156996
81	cg08450091		3	82857215
82	cg08514194	KRTAP12-4;C21orf29	21	46075092
83	cg08522473	TAGLN3	3	111730545
84	cg08603678	EIF3E	8	109235928
85	cg08708231	OPCML	11	132992485
86	cg08896901		4	152996165
87	cg08916385	GNRHR	4	68622534
88	cg08963013	LRRTM4	2	77235218
89	cg09137533		22	46469091
90	cg09146088		5	145305089
91	cg09182085		20	55665224
92	cg09247979	PTPRK	6	128530306
93	cg09275602		7	66370330
94	cg09382842	HLA-C	6	31237405
95	cg09411910	HLA-DQA1	6	32607224
96	cg09556042	HLA-C	6	31237013
97	cg09584650	MYOM2	8	2002012
98	cg09636756	ATP9B	18	77134251
99	cg09654329	RGS12	4	3413614
100	cg09768983		4	183935060
101	cg09866143	SLC12A8	3	124861521
102	cg10092377	C1orf106;C1orf106	1	200880981
103	cg10117599	PRKAR1B	7	624424
104	cg10180404	HLA-DQB1	6	32632334
105	cg10307230	NAT15	16	3519514
106	cg10410513	ARHGEF10	8	1893887
107	cg10482512	CCR6	6	167524238
108	cg10523679	ACADM	1	76189770
109	cg10528424	SYT8	11	1858572
110	cg10552993		11	122427414
111	cg10590622	PDHA2	4	96760945
112	cg10596483	JRK	8	143751796
113	cg10632770	KIAA1199	15	81122346
114	cg10645648	HLA-DQA2	6	32711617

115	cg10662047	GRAMD1B	11	123472546
116	cg10738648	ARPC3	12	110888857
117	cg10879348	LIMS1	2	109251064
118	cg10942914		5	134356114
119	cg10982913	HLA-DQB1	6	32632731
120	cg11128983	CPLX2	5	175297531
121	cg11400068		5	6700750
122	cg11418607		15	67323243
123	cg11420142		8	92570895
124	cg11587069		4	146656091
125	cg11645539	DDO	6	110732115
126	cg11727304	GALNTL5	7	151653523
127	cg11738485	HOOK2	19	12877000
128	cg11786587		5	178208610
129	cg11792281	NLK	17	26443366
130	cg11866463	RCAN1	21	35982790
131	cg11963436	TNKS2	10	93567261
132	cg12011299	ADH4	4	100065546
133	cg12169700	MAD1L1	7	1923695
134	cg12342501		2	8530521
135	cg12434901	KCNH6	17	61602292
136	cg12475902		1	6764205
137	cg12952561		7	100300649
138	cg13009819	HLA-DQA1	6	32609094
139	cg13116816	C7orf23	7	86839071
140	cg13211008	ESYT2	7	158541253
141	cg13248811	SOD3	4	24796803
142	cg13297560	IGF1R	15	99320054
143	cg13306870	CBX7	22	39527583
144	cg13387643	CASZ1	1	10737562
145	cg13603318	CCDC46	17	63926873
146	cg13748354	NUDT1	7	2289888
147	cg13894852		17	47502298
148	cg13916633		11	35644854
149	cg13935315	ZNF443	19	12547760
150	cg13950674	SPRR2B	1	153044071
151	cg14069205	ABCA10;ABCA5	17	67241141
152	cg14112997	IL17RA	22	17591088
153	cg14548901	ROCK2	2	11430093

154	cg14651435	DNAJB6	7	157209551
155	cg14655569	BICD2	9	95473718
156	cg14834300		1	152506886
157	cg14927855		7	155151427
158	cg14995921	SNORA15;CCT6A	7	56126830
159	cg15250633	RAB40B	17	80627638
160	cg15360451		12	131057032
161	cg15377887		21	42440661
162	cg15506703		2	242844601
163	cg15567368		7	563891
164	cg15627180	TMPRSS4	11	117970688
165	cg15909443		5	17381798
166	cg15985500	MPPED2	11	30602788
167	cg15988569	PNLIPRP2	10	118380345
168	cg16069065		7	129412730
169	cg16112880	TMEM9	1	201123745
170	cg16116239		7	65825620
171	cg16301894		4	129389744
172	cg16310958	ABHD12	20	25281332
173	cg16320888		6	22356972
174	cg16490124	SNORA14B;TOMM20	1	235292369
175	cg16554153	SAMD9	7	92745288
176	cg16784985	PDE9A	21	44105474
177	cg16810310	BRMS1;RIN1	11	66104993
178	cg16908938	GREB1	2	11728079
179	cg16914890		2	242839615
180	cg16956665	STT3A	11	125479362
181	cg17341969	SNPH	20	1287050
182	cg17420885	LOC339524	1	87600446
183	cg17530337	DHX37	12	125450666
184	cg17661798		20	52821599
185	cg17770035	NCR2	6	41312735
186	cg17858192	PROM1	4	16077807
187	cg18285337		1	11783294
188	cg18339359	SLC25A37	8	23423757
189	cg18409782		5	136243322
190	cg18514595		22	49579968
191	cg18618432		19	34621907
192	cg18621672	DYDC1	10	82112873

193	cg18674961	PPP1R16B	20	37438823
194	cg18827503		13	112574260
195	cg18875674	ARHGEF17	11	73026651
196	cg18938907	GSTM1	1	110230456
197	cg19079513		17	14936230
198	cg19080354	ATHL1	11	288021
199	cg19218082	COL4A2	13	111111172
200	cg19235645	FAM101A	12	124787691
201	cg19300401		6	16962712
202	cg19360212	NSMCE4A	10	123731471
203	cg19484093		4	119990940
204	cg19596870	SERPIN6	6	2972896
205	cg19653246	MIR654;MIR376B;MIR376A1;MIR376A2;MIR376C	14	101505898
206	cg19907915	IGSF9B	11	133821252
207	cg20089799	TSPAN9	12	3384898
208	cg20987072		1	169631737
209	cg21223191		6	32583741
210	cg21493951	HLA-DQB1	6	32632338
211	cg21573231	SDCCAG8	1	243496008
212	cg21685655	PON2	7	95034251
213	cg21829038	LRRK1	15	101593831
214	cg22274273		6	135137590
215	cg22337626	MAST2	1	46420220
216	cg22707393		2	47115827
217	cg22710716	NT5DC2	3	52569097
218	cg22730047		1	161410551
219	cg22851875		5	65888284
220	cg22875332	ACADM;ACADM	1	76189707
221	cg23052585		10	50328538
222	cg23464743	HLA-DQB1	6	32633163
223	cg23603995	ARID1B	6	157198648
224	cg23813394	COL6A3	2	238252272
225	cg23840008		15	60706369
226	cg23892028		6	27256345
227	cg23899408	HOOK2	19	12877188
228	cg24057558		17	212481
229	cg24088508	C1orf109	1	38156462
230	cg24263062	EBF4	20	2730191
231	cg24470466	HLA-DQA1	6	32608858

232	cg24593918	HLA-DQB1	6	32633157
233	cg24638099	HLA-DRB6	6	32526027
234	cg24851651	CCS	11	66362959
235	cg25165144	B4GALNT3	12	670974
236	cg25174111	MUS81	11	65631880
237	cg25184502		5	176435980
238	cg25347356	ARHGAP18	6	130007252
239	cg25569462	TRIML2	4	189026860
240	cg25587481	PRKCE	2	46396825
241	cg26077133	MSRA	8	10049871
242	cg26303777	GALNT2	1	230311676
243	cg26469782		4	4117213
244	cg26607620	DLGAP2	8	1497078
245	cg26654770	NINJ2	12	740100
246	cg26813483	C13orf16	13	111980537
247	cg27086157	RASA3	13	114872606
248	cg27275133	GUSBL1	6	26860451
249	cg27286614	MAD1L1	7	2050401
250	cg27395310		18	58996785
251	cg27462519		16	3242639
252	cg27534679		2	235005011
253	cg27649396	C11orf53	11	111148753
254	ch.8.2353618R	SAMD12	8	119282796

Tabelle 4: Tabelle der 254 differentiell methylierten CpG-Loci. Nebeneinander aufgelistet sind die Nummer (1-254), die Target-ID, der jeweilige Genname (UCSC_Refgene_Name), das zugehörige Chromosom und die Mapinfo (Build GRCh37/hg19).

7.3 Untersuchung auf bekannte Imprintingstörungen

Allen in der nachfolgenden Tabelle aufgelisteten Loci sind Imprinting-Störungen mit bekanntem klinischem Phänotyp zugeordnet. Es folgt eine Heatmap-Darstellung aller Loci dieser Regionen, die auf dem Infinium *HumanMethylation450 BeadChip* analysiert werden. Die Heatmaps für die Gene *MEG3* und *IGF2* sind bereits im Ergebnisteil abgebildet, da hier aberrante DNA-Methylierungen aufgefallen waren (Abbildungen 7 und 8). Alle anderen Heatmaps zeigen unauffällige Ergebnisse.

Locus	Chromosomale Region
<i>PLAGL1</i>	6q24.2
<i>GRB10</i>	7p12.2
<i>MEST</i>	7q32.2
<i>H19</i>	11p15.5
<i>KCNQ1OT1/KCNQ1</i>	11p15.5
<i>IGF2</i>	11p15.5
<i>MEG3</i>	14q32
<i>SNRPN</i>	15q11.2
<i>GNAS</i>	20q13.2

Tabelle 1: Tabelle der Loci, die mit Imprinting-Störungen mit bekanntem klinischem Phänotyp einhergehen. Modifiziert nach Poole et al. (2010) und Mackay et al. (2008).

7.3.1 Heatmap des *PLAGL1*-Locus

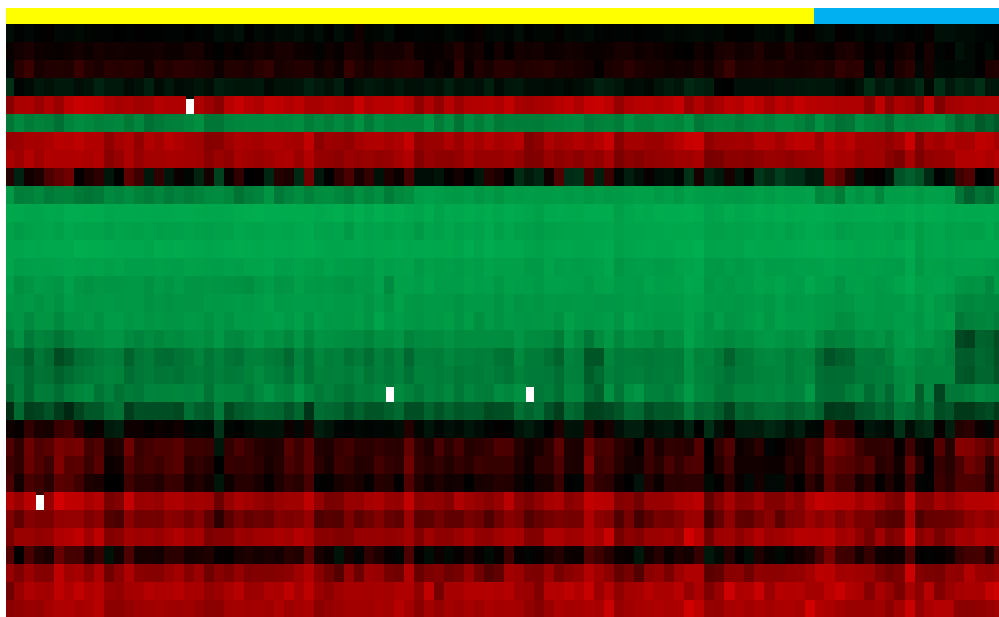


Abbildung 17: Heatmap des *PLAGL1*-Locus

■ Patienten 1 bis 82 (von links nach rechts)

■ Kontrollen 1 bis 19 (von links nach rechts)

Zeilen: nach der Mapinfo sortierte, auf dem Array analysierte CpG-Loci von *PLAGL1*

→ DNA-Methylierung von 0%-Methylierung (grün) bis 100%-Methylierung (rot)

7.3.2 Heatmap des *GRB10*-Locus

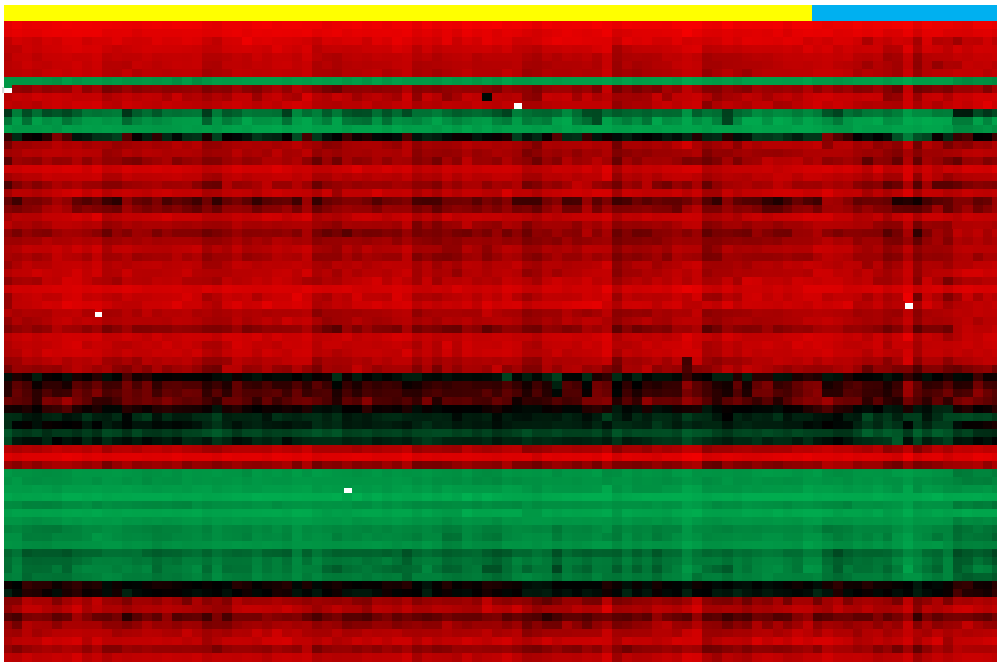


Abbildung 18: Heatmap des *GRB10*-Locus

■ Patienten 1 bis 82 (von links nach rechts)

■ Kontrollen 1 bis 19 (von links nach rechts)

Zeilen: nach der Mapinfo sortierte, auf dem Array analysierte CpG-Loci von *GRB10*

→ DNA-Methylierung von 0%-Methylierung (grün) bis 100%-Methylierung (rot)

7.3.3 Heatmap des *MEST*-Locus

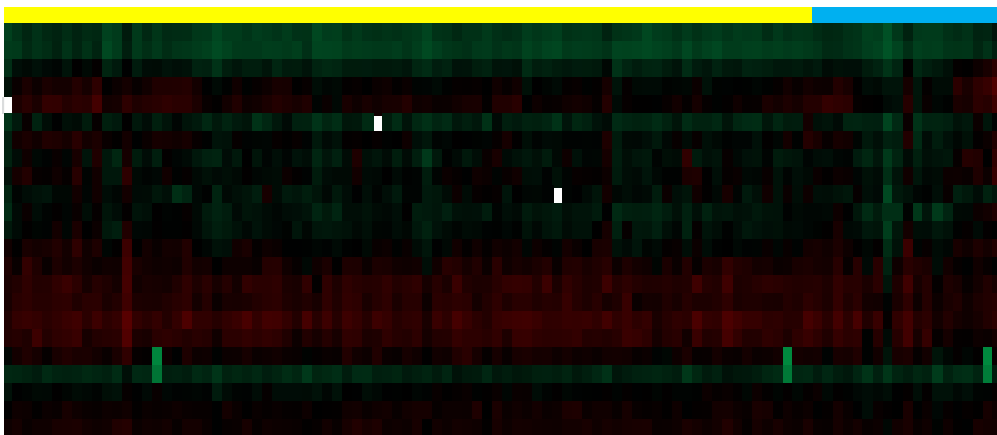


Abbildung 19: Heatmap des *MEST*-Locus

■ Patienten 1 bis 82 (von links nach rechts)

■ Kontrollen 1 bis 19 (von links nach rechts)

Zeilen: nach der Mapinfo sortierte, auf dem Array analysierte CpG-Loci von *MEST*

→ DNA-Methylierung von 0%-Methylierung (grün) bis 100%-Methylierung (rot)

7.3.4 Heatmap des *H19*-Locus

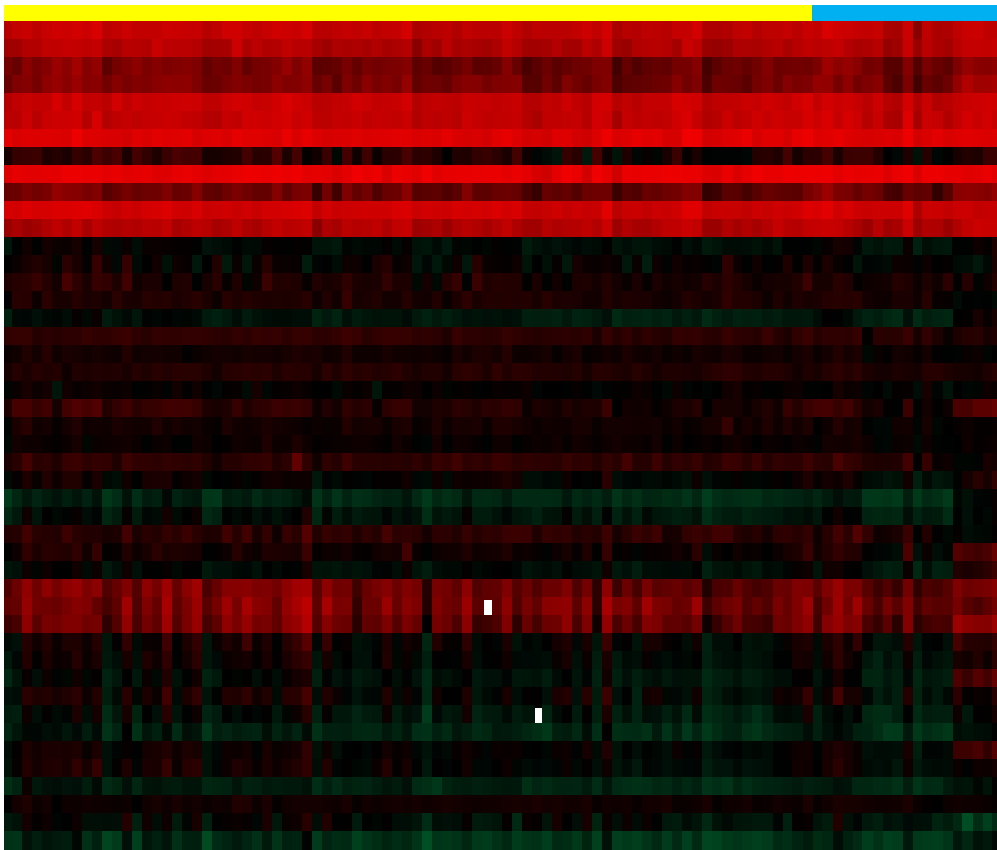


Abbildung 20: Heatmap des *H19*-Locus

■ Patienten 1 bis 82 (von links nach rechts)

■ Kontrollen 1 bis 19 (von links nach rechts)

Zeilen: nach der Mapinfo sortierte, auf dem Array analysierte CpG-Loci von *H19*

→ DNA-Methylierung von 0%-Methylierung (grün) bis 100%-Methylierung (rot)

7.3.5 Heatmap des *KCNQ1*-Locus

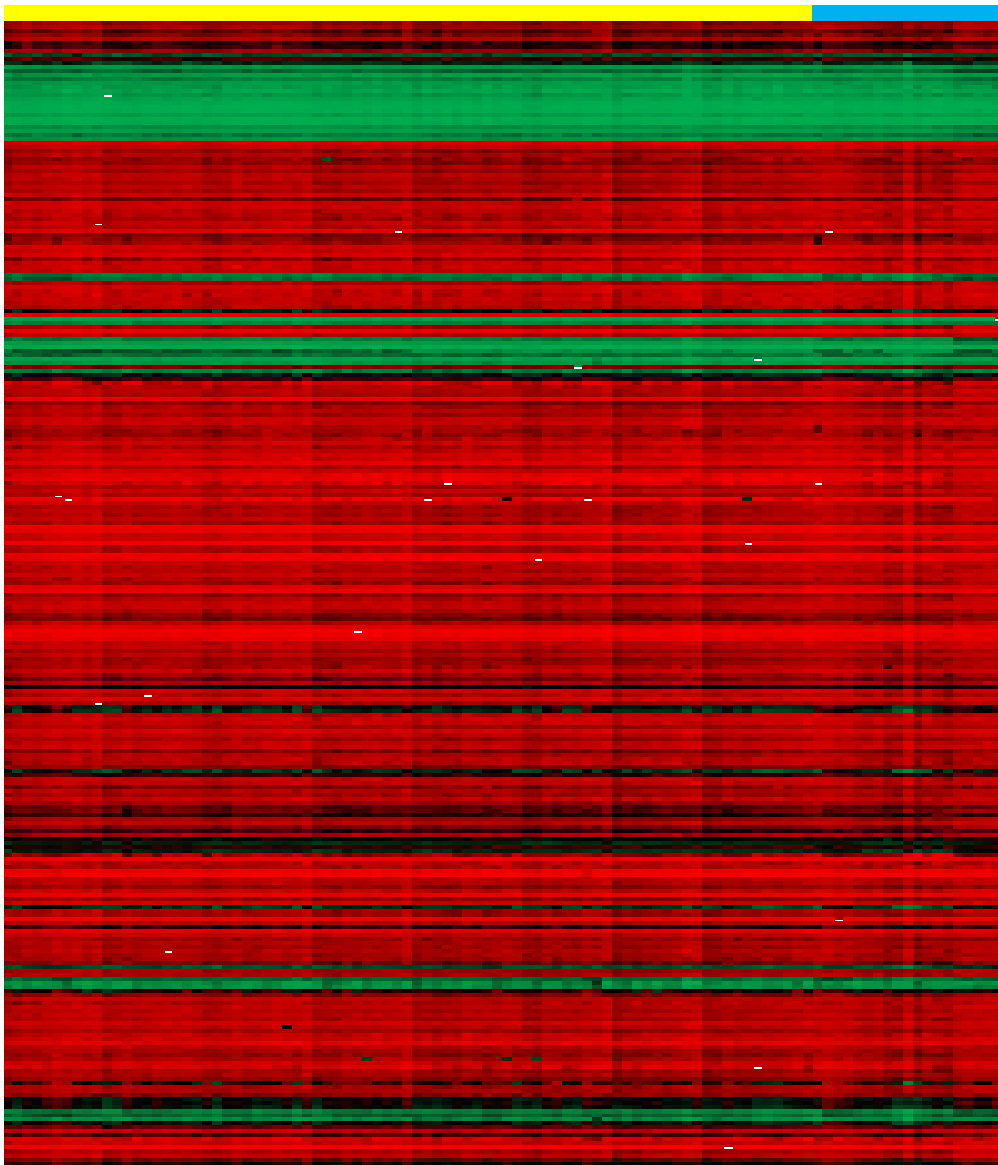


Abbildung 21: Heatmap des *KCNQ1*-Locus

■ Patienten 1 bis 82 (von links nach rechts)

■ Kontrollen 1 bis 19 (von links nach rechts)

Zeilen: nach der Mapinfo sortierte, auf dem Array analysierte CpG-Loci von *KCNQ1*

→ DNA-Methylierung von 0%-Methylierung (grün) bis 100%-Methylierung (rot)

7.3.6 Heatmap des *GNASAS*-Locus

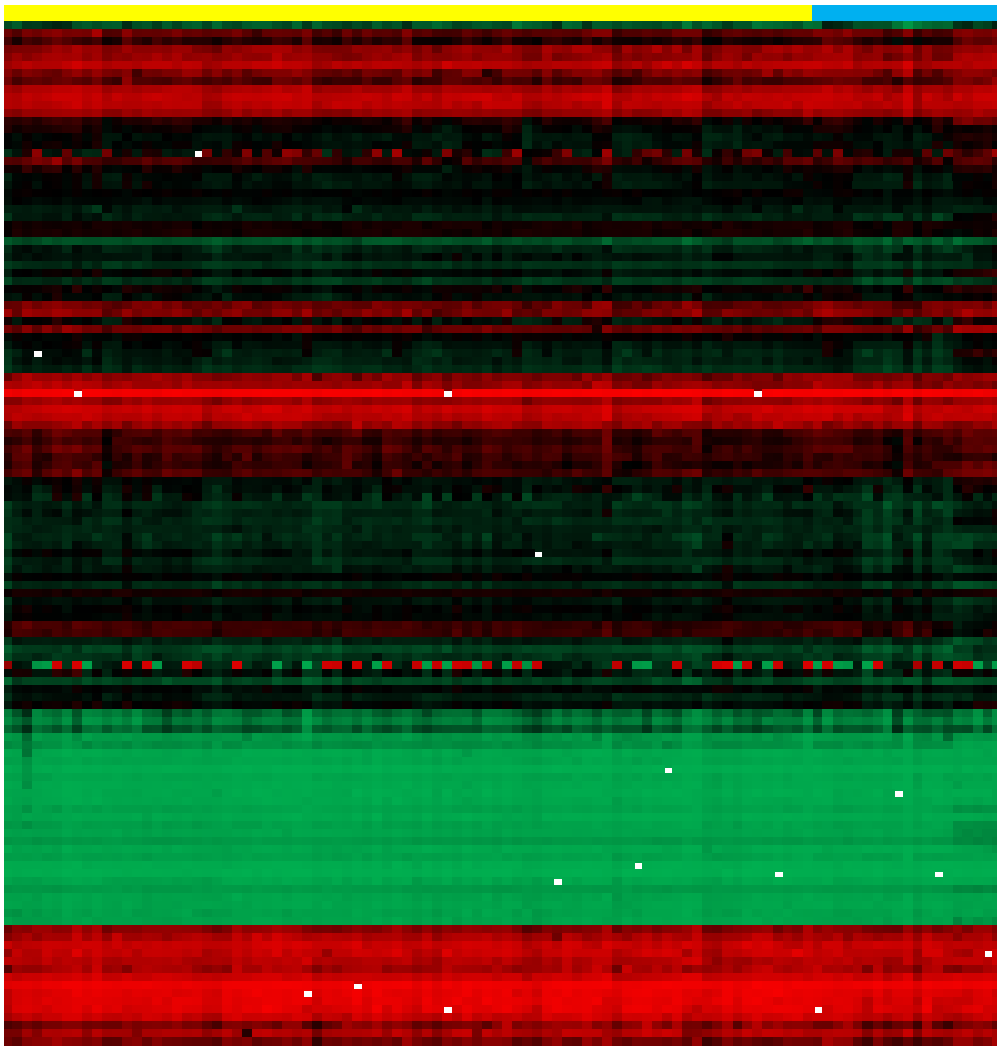


Abbildung 22: Heatmap des *GNASAS*-Locus

■ Patienten 1 bis 82 (von links nach rechts)

■ Kontrollen 1 bis 19 (von links nach rechts)

Zeilen: nach der Mapinfo sortierte, auf dem Array analysierte CpG-Loci von *GNASAS*

→ DNA-Methylierung von 0%-Methylierung (grün) bis 100%-Methylierung (rot)

7.3.7 Heatmap des *SNRPN*-Locus

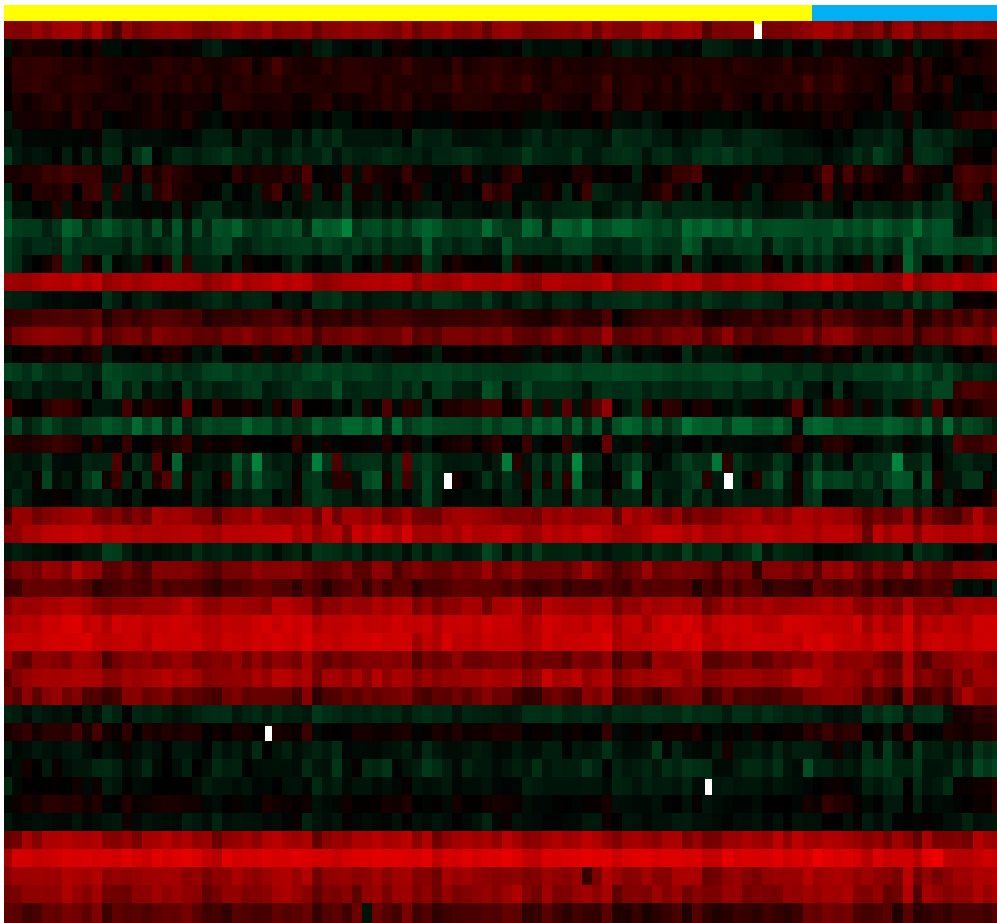


Abbildung 23: Heatmap des *SNRPN*-Locus

■ Patienten 1 bis 82 (von links nach rechts)

■ Kontrollen 1 bis 19 (von links nach rechts)

Zeilen: nach der Mapinfo sortierte, auf dem Array analysierte CpG-Loci von *SNRPN*

→ DNA-Methylierung von 0%-Methylierung (grün) bis 100%-Methylierung (rot)

7.4. Tabelle geprägter Loci

Die hier abgebildete Tabelle 5 ergänzt Tabelle 1 um in der aktuellen Forschung neu identifizierte geprägte Loci nach Court et al. aus dem Jahr 2014.

Locus	Chromosom
<i>DIRAS3</i>	1
<i>ZDBF2</i>	2
<i>NAPIL5</i>	4
<i>FAM50B</i>	6
<i>IGF2R</i>	6
<i>WDR27</i>	6
<i>PEG10</i>	7
<i>HTR5A</i>	7
<i>TRAPPC9</i>	8
<i>CXORF56 pseudogene/ERLIN2</i>	8
<i>INPP5F</i>	10
<i>KvDRM1</i>	11
<i>RBI</i>	13
<i>MKRN3/MIR4508</i>	15
<i>MAGEL2</i>	15
<i>IGF1R</i>	15
<i>ZNF597/NAA60</i>	16
<i>ZNF331</i>	19
<i>PEG3</i>	19
<i>MCTS2/HM13</i>	20
<i>BLCAP/NNAT</i>	20
<i>L3MBTL</i>	20
<i>WRB</i>	21
<i>NHP2L1</i>	22

Tabelle 5: Tabelle neu identifizierter geprägter Loci als Ergänzung zu Tabelle 1 nach Court et al. 2014.

8. Danksagung

Zuerst möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. O. Ammerpohl für die Überlassung des interessanten Themengebietes bedanken, ebenso für die stetige Unterstützung bei der Entwicklung meiner Arbeit, für die statistische Auswertung der DNA-Methylierungsanalysen sowie für die zielführenden Vorschläge und die konstruktive Kritik.

Ich danke ganz besonders herzlich auch Frau PD Dr. med. A. Caliebe für die hervorragende Betreuung, die vielen Verbesserungsvorschläge und die klinische Begleitung dieser Arbeit.

Ein weiterer herzlicher Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. R. Siebert für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig Holstein, Campus Kiel, sowie für die kompetente Beratung bei der Durchführung meiner Arbeit. Ich bedanke mich auch für Möglichkeit der Präsentation meiner Arbeit im Rahmen eines Kurzvortrages bei dem Norddeutschen Humangenetiker Treffen 2011 in Kiel.

Ebenfalls danken möchte ich Frau PD Dr. med. S. Bens für die Unterstützung und die Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse der Pyrosequenzierung und der MLPA.

Frau Dipl. Biol. J. Gutwein danke ich sehr herzlich für die Durchführung der Array-Analysen sowie für die Hilfe bei der Auswertung der Analysen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med U. Stephani, Direktor der Klinik für Neuropädiatrie des Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel, für die Zusammenarbeit bei der Zusammenstellung des Patientenkollektivs.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. med. G. Gillessen-Kaesbach, Direktorin des Instituts für Humangenetik des Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Lübeck, für die Möglichkeit, eine institutsübergreifende Patientengruppe zu bilden; durch diese Kooperation war es möglich, eine für Schleswig-Holstein repräsentative Patientengruppe zu bilden.

Mein Dank geht auch an Frau Dr. M. Ryzanicz des Institute of Human Genetics, Poznan in Polen für die Möglichkeit der Kooperation und für die Vervollständigung des Kontrollprobenkollektivs.

Ich danke außerdem allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik, Campus Kiel, für die Hilfe bei jeglichen Fragen. Ganz besonders möchte ich mich bei Frau U. Jakobsen und Frau E. Heiden für die hervorragende Unterstützung im Labor bedanken.

Abschließend bedanke ich mich bei meinen Eltern und ganz besonders bei meiner Schwester für die Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Imke Maria Tangen

Geburtsdatum: 27.02.1988

Geburtsort: Ibbenbüren

Anschrift: Muhliusstraße 68, 24103 Kiel

Telefonnummer: 0431-24785454

E-Mail: Imke.Tangen@gmx.de

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1994-1998: Ludwiggrundschule Ibbenbüren

1998-2007: Goethe-Gymnasium Ibbenbüren

31.05.2007: Allgemeine Hochschulreife

Studium der Humanmedizin:

Ab Wintersemester 07/08: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

19.08.2009: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Januar 2011: Aufnahme des Promotionsvorhabens am Institut für Humangenetik der
Universitätsklinik Schleswig Holstein, Campus Kiel

11.12.2013: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Ärztliche Tätigkeit:

Ab 01.02.2014: Assistenzärztin Innere Medizin, Inland Klinik Rendsburg

10. Veröffentlichungen

Julia Kolarova ^{1*}, Imke Tangen ^{1*}, Susanne Bens ¹, Gabriele Gillessen-Kaesbach ², Jana Gutwein ¹, Monika Kautza ¹, Malgorzata Rydzanic ^{3,4}, Ulrich Stephani ⁵, Reiner Siebert ¹, Ole Ammerpohl ¹⁺, Almuth Caliebe ¹⁺ (2015): Array-based DNA-Methylation analysis of individuals with developmental delay/ intellectual disability and normal molecular karyotype. *European Journal of Medical Genetics*, doi: 10.1016/j.ejmg.2015.05.001.

(1) Institute of Human Genetics, Christian-Albrechts-University & University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel, Germany

(2) Institute of Human Genetics, University Lübeck & University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Lübeck, Germany

(3) Department of Molecular Pathology, Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Strzeszynska 32 St, 60-479 Poznan, Poland

(4) present affiliation: Department of Medical Genetics, Medical University of Warsaw, Pawinskiego 3c St, 02-106 Warsaw, Poland

(5) Department of Neuropediatrics, University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel, Germany

* IT and JK contributed equally to this work

+ OA and AC share senior authorship

Imke Tangen¹, Peter Sporns¹, Susanne Bens¹, Jana Gutwein¹, Ute Jacobsen¹, Malgorzata Rydzanicz^{2,3}, Ulrich Stephani⁴, Gabriele Gillessen-Kaesbach⁵, Reiner Siebert¹, Ole Ammerpohl¹, Almuth Caliebe¹: Intellectually disabled children with normal molecular karyotypes: Genome-wide screening for altered methylation. Posterpräsentation bei der European Human Genetics Conference (ESHG) vom 23. bis 26. Juni 2012 in Nürnberg

(1) Institute of Human Genetics, Christian-Albrechts-University & University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel, Germany

(2) Department of Molecular Pathology, Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Strzeszynska 32 St, 60-479 Poznan, Poland

(3) present affiliation: Department of Medical Genetics, Medical University of Warsaw, Pawinskiego 3c St, 02-106 Warsaw, Poland

(4) Department of Neuropediatrics, University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel, Germany

(5) Institute of Human Genetics, University Lübeck & University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Lübeck, Germany

Die Daten dieser Arbeit wurden außerdem bei der Jahrestagung der Norddeutschen Human-
genetiker am 05.11.2011 in Kiel im Rahmen eines Kurzvortrages unter dem Titel „Sind Ver-
änderungen des DNA-Methylierungsmusters assoziiert mit ungeklärten Fehlbildungs-
Retardierungssyndromen?“ von mir vorgestellt.