



**Gestationsdiabetes und fetale Programmierung:
Epigenetische Untersuchungen mit verschiedenen Next
Generation Sequencing Techniken**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
-Doctor rerum naturalium-
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Larissa Haertle

geboren in
Hardheim

Würzburg, 2017

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Haaf

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Charlotte Förster

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Eidesstattliche Versicherung

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2014 bis September 2017 am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg unter Betreuung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Haaf angefertigt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Gestationsdiabetes und fetale Programmierung: Epigenetische Untersuchungen mit verschiedenen Next Generation Sequencing Techniken“ selbständig und ohne Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung sowie ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst zu haben. Die den herangezogenen Werken wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Ich erkläre hiermit, dass die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten wurden. Die Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Am 01.08.2011 wurde mir von der Julius-Maximilians-Universität Würzburg der akademische Grad „Bachelor of Science“ verliehen und am 04.12.2013 der „Master of Science“. Weitere akademische Grade habe ich nicht erworben.

.....

Ort, Datum

.....

Unterschrift (Larissa Haertle)

Danksagung

Eine Doktorarbeit ist niemals nur die Arbeit eines Einzelnen, deshalb möchte ich an dieser Stelle meinen Dank für all die Unterstützung und Hilfe zum Ausdruck bringen, die mir in den vergangenen Jahren von vielen Menschen zuteil wurde.

- An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Erstgutachter Herrn Prof. Dr. Thomas Haaf für die Betreuung meiner Promotion bedanken. Sie ermöglichten mir ein eigenverantwortliches Arbeiten und lenkten mich dabei immer in die richtige Richtung. Durch unzählige wissenschaftliche Anregungen/Hilfestellungen, sowie Ihrem reichen Wissensfundus, wurde diese Arbeit überhaupt erst möglich.
- Mein ausdrücklicher Dank gebührt außerdem Frau Prof. Dr. Charlotte Förster, die sich sofort dazu bereit erklärte (im Namen der Fakultät für Biologie) das Zweitgutachten zu übernehmen.
- Für sehr guten fachlichen Input und eine tolle Zusammenarbeit hinsichtlich der bioinformatischen Datenauswertung möchte ich mich bei Dr. Silke Appenzeller, Beat Wolf, Dr. Dr. Marcus Dittrich, sowie Dr. Tobias Müller bedanken.
- Herrn Dr. Harald Lehnen danke ich für die Sammlung und Bereitstellung der (ausnehmend gut charakterisierten) GDM-Probensammlung.
- Ein großes Dankeschön geht an Dr. Nady El Hajj und Dr. Eberhard Schneider für kontinuierliche Motivation (auch schon während der Masterarbeit), thematische Unterstützung, bereichernde Ausführungen und viele inhaltliche Diskussionen.
- Für Hilfe bei der Einarbeitung, viele hilfreiche Ratschläge und das Schaffen eines wirklich warmen Arbeitsklimas, möchte ich mich bei allen andern Mitgliedern des Instituts für Humangenetik bedanken. Ich habe mich hier immer sehr wohl gefühlt und viele freundschaftliche Wegbegleiter gefunden. Besonderer Dank geht an Julia Böck und Anna Maierhofer.
- Vielen Dank an Cornelia Vogt und Stefanie Atsem für das Korrekturlesen dieser Dissertation und ihre Freundschaft über die gemeinsame Masterarbeitszeit hinaus.
- Ich möchte mich außerdem bei meinen Eltern und meiner kleinen Schwester bedanken. Ich weiß, dass ihr mir in allen Lebenslagen zur Seite steht. Danke dafür!

Zusammenfassung

Eine intrauterine Gestationsdiabetes (GDM) Exposition induziert in den betroffenen Nachkommen eine lebenslang erhöhte Prädisposition für metabolische und komplexe Erkrankungen. Die Krankheitssuszeptibilität wird dabei durch epigenetische Veränderungen vermittelt, die sich über die Regulation der Genaktivität auch auf das Expressionsniveau und den Phänotypen auswirken. Um neue Gene zu finden, die eine Rolle in der fetalen Programmierung spielen, wurden in dieser Arbeit genomweite Methylierungsmuster von Nabelschnurbluten (FCBs) aus GDM-Schwangerschaften und Kontrollen miteinander verglichen. Mit Illumina Infinium HumanMethylation 450K Arrays konnten signifikante Gruppenunterschiede für insgesamt 65 CpG-Stellen (52 davon genassoziiert) festgestellt werden, die multiplem Testen standhielten. Mittels Pyrosequenzierung wurden vier dieser Kandidaten-Loci (*ATP5A1*, *MFAP4*, *PRKCH*, *SLC17A4*), sowie ein Gen aus der Literatur (*HIF3A*) genauer untersucht und die Effekte erfolgreich validiert. Für das zugrundeliegende multivariate Regressionsmodell wurden die potenziellen Störfaktoren Gestationsalter, kindliches Geschlecht und mütterlicher BMI berücksichtigt. Der GDM-Effekt zeigte sich stärker in der insulinbehandelten Subgruppe (I-GDM) als in der diätisch behandelten (D-GDM) und scheint insgesamt multifaktoriell bedingt zu sein, da viele Gene betroffen waren, jedoch alle mit einer vergleichsweise niedrigen Effekt-Größe. Zusätzlich konnten für den *MEG3* Promotor, *MEST* und *PEG3*, drei von vier geprägten Genen, die mittels Deep Bisulfite Sequencings (DBS) analysiert wurden, ebenfalls signifikante Methylierungsunterschiede zwischen der GDM- und Kontroll-Gruppe detektiert werden. Die identifizierten Gene stellen labile Zielregionen für die GDM-induzierte intrauterine Programmierung dar und können zukünftig nützliche Biomarker für Krankheitsdiagnosen und Prognosen sein. Mittels DBS können darüber hinaus Einzelmolekül-Analysen durchgeführt werden, für die in differentiell methylierten Regionen (DMRs) anhand eines informativen SNPs die parentale Allel-Herkunft bestimmt und bei der Berechnung von Epimutationsraten einbezogen werden kann. Epimutationen wurde als solche gewertet, wenn sie ein > 50 % abnormal (de)methyliertes Methylierungsprofil aufwiesen. Die DBS-Daten wurden mit zwei verschiedenen Sequenzierplattformen generiert (Roche GS Junior und Illumina MiSeq). Für Zweitere wurde ein eigenes, unabhängiges Library-Präparations-Protokoll entwickelt. In Nabelschnurblut, adultem Blut und Viszeralfett wurden für die paternal exprimierte *MEST*

Promotor DMR und die maternal exprimierte *MEG3* intergenic (IG) DMR hohe Epimutationsraten für das jeweils unmethylierte Allel detektiert. Die geprägten (methylierten) Allele wiesen dagegen nur niedrige Epimutationsraten auf. Da *MEST* und *MEG3* invers geprägte Gene sind, war die Hypermethylierung des nicht geprägten Allels (HNA) demnach unabhängig von der parentalen Allel-Herkunft. Die HNA scheint außerdem erst nach der Fertilisation aufzutreten, da in Spermien nur sehr wenige Epimutationen gefunden wurden. Für die sekundäre *MEG3* Promotor DMR (deren Prägung von der primären *MEG3* IG-DMR reguliert wird) wurde ein deutlich schwächerer, wenngleich signifikanter HNA-Effekt im FCB gemessen, für die paternal exprimierte *PEG3* Promotor DMR konnte dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden parentalen Epimutationsraten festgestellt werden. Der HNA-Effekt für die *MEST* DMR, *MEG3* IG-DMR und *MEG3* Promotor DMR war weder mit GDM noch mit Adipositas assoziiert und zeigte allgemein eine große interindividuelle Varianz. Die Aufrechterhaltung differenzieller Methylierungsmuster in Imprinting Kontrollregionen (ICRs) scheint in manchen Entwicklungs-Zeitspannen von großer Bedeutung und damit streng kontrolliert zu sein, später jedoch redundant zu werden, was sich in der Anreicherung von stochastischen sowie umweltinduzierten Fehlern auf dem nicht geprägten Allel äußern kann. HNA-suszeptible geprägte Gene ähneln in mancherlei Hinsicht metastabilen Epiallelen. Diese Studie zeigt, dass sowohl stochastische Faktoren als auch Umweltstimuli während der frühen embryonalen Entwicklung u.a. über HNA-Effekte geprägte Gen-Netzwerke programmieren, die in Wachstumsprozesse involviert sind. Um tiefere Einblicke in allelspezifische Prägungsprofile zu erhalten, wären umfangreiche DBS HNA-Längsschnittstudien aller 50-100 human geprägten Gene in unterschiedlichen Gewebetypen und Differenzierungsstadien wünschenswert.

Summary

Intrauterine exposure to gestational diabetes mellitus (GDM) induces lifelong increased predisposition for metabolic and complex diseases in the exposed progeny. The elevated disease susceptibility is transmitted via epigenetic alterations that influence gene expression levels and phenotypes through regulation of gene activity. Genome-wide methylation profiles of fetal cord bloods (FCBs) were investigated in GDM and control pregnancies in order to identify new genes susceptible to fetal programming. After multiple testing correction, we found 65 significantly differentially methylated CpG sites between GDM and control groups (52 of which were gene associated) within the Illumina Infinium HumanMethylation 450K array data. Using pyrosequencing, we successfully confirmed the observed results in four of these candidate loci (*ATP5A1*, *MFAP4*, *PRKCH*, *SLC17A4*) and one gene from the literature (*HIF3A*). A multivariate regression model was adjusted for the confounding factors gestational age, fetal sex and maternal BMI. The GDM effect was stronger within the insulin treated subgroup (I-GDM) compared to the dietary subgroup (D-GDM), suggesting that GDM is a multifactorial disease evidenced by changes of small effect size in multiple genes. Significant mean methylation differences were detected between the GDM group and controls in three out of four imprinted genes (*MEG3* promoter, *MEST* and *PEG3*) that were analyzed with Deep Bisulfite Sequencing (DBS). The identified genes represent labile target regions for GDM-induced intrauterine programming and could represent future biomarkers for disease diagnosis and prognosis. Furthermore, DBS enables sequencing at a single allele resolution and the calculation of allele specific epimutation rates by differentiating the parental origin of alleles via an informative SNP within differentially methylated regions (DMRs). Epimutations were characterized as alleles showing > 50 % aberrantly (de)methylated CpG sites. DBS data were generated using two different sequencing platforms (Roche GS Junior and Illumina MiSeq). An independent library preparation protocol was established for Illumina MiSeq sequencing. The paternally expressed *MEST* promoter DMR and the maternally expressed *MEG3* intergenic (IG) DMR showed high epimutation rates for the unmethylated alleles in FCB, as well as adult blood and visceral adipose tissue. On the contrary, only minor epimutation rates were displayed by the imprinted (methylated) alleles. Thus, hypermethylation of the non-imprinted allele (HNA) was independent of parental origin, as *MEST* and *MEG3* are opposingly imprinted

genes. Very low epimutation rates in sperm indicate that the HNA effect arises after fertilization. A weak but significant HNA was also found for the secondary *MEG3* promoter DMR (which is known to be regulated by the *MEG3* IG-DMR). The paternally expressed *PEG3* promoter DMR showed no HNA and no difference in parental epimutation rates. The observed HNA effect (for the *MEST* DMR, the *MEG3* IG-DMR and the *MEG3* promoter DMR) was neither associated with GDM nor obesity and exhibited a large interindividual variance. Maintenance of differential methylation profiles in imprinting control regions (ICRs) seems to be of great importance during some developmental periods and is therefore strictly controlled in germ cells. Later on, it might become redundant manifested in the accumulation of stochastic as well as environmentally-induced errors on the non-imprinted allele. There is evidence that HNA-susceptible imprinted genes resemble metastable epialleles in many aspects. Therefore, we suggest that stochastic as well as environmental stimuli program imprinted gene networks that are important for growth related processes during early development using HNA. Further longitudinal studies of all 50 – 100 imprinted genes would benefit in a deeper insight in allele-specific imprinting patterns of various human tissues.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Versicherung	I
Danksagung	II
Zusammenfassung	III
Summary.....	V
1 Einleitung	5
1.1 Epigenetik	5
1.1.1 Epigenetische Modifizierungen.....	5
1.1.2 DNA-Methylierung	7
1.1.3 Histonmodifikationen.....	9
1.2 Prinzip der genomischen Prägung	10
1.2.1 Epigenetische Genomreprogrammierung.....	12
1.2.2 Entstehungstheorien und Funktion von geprägten Genen	15
1.2.3 Imprinting-Störungen	17
1.2.3.1 Der Prader-Willi (PWS)/Angelman Syndrom (AS) Genlocus.....	20
1.2.3.2 Der Silver-Rusell (SRS)/Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS) Genlocus .	21
1.2.3.3 Andere Imprinting-Krankheiten.....	22
1.3 Barker Hypothese und Epigenetik (Exposition-Response-Beziehung)	24
1.4 Gestationsdiabetes mellitus (GDM)	25
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	28
2 Material und Methoden	30
2.1 Material	30
2.1.1 Biologisches Material	30
2.1.2 Materialien für Aufbau, Durchführung und Auswertung der Versuche	34
2.1.2.1 Kommerzielle Kits und Reagenzien.....	35
2.1.2.2 Chemikalien.....	35
2.1.2.3 Apparaturen	36
2.1.2.4 Programme	37
2.1.2.5 Pufferlösungen.....	38
2.1.3 Primer Sequenzen	38
2.2 Methoden	49

2.2.1	Isolation genomischer DNA.....	49
2.2.2	Bisulfitkonvertierung.....	50
2.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	52
2.2.4	Gelelektrophorese	58
2.2.5	Reverse Transkription quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR)	59
2.2.6	Methoden zur Bisulfitsequenzierung.....	61
2.2.6.1	Illumina Infinium HumanMethylation 450 K Array.....	62
2.2.6.1.1	Infinium I Assay.....	63
2.2.6.1.2	Infinium II Assay.....	64
2.2.6.1.3	Array-Auswertung und Statistik.....	67
2.2.6.2	Pyrosequenzierung zur Genotypisierung/Methylierungsquantifizierung ..	68
2.2.6.3	DBS mit dem Roche GS Junior	72
2.2.6.3.1	Erste und Zweite PCR zur Amplikon-Generierung.....	73
2.2.6.3.2	SPRI DNA-Bead-Aufreinigung	75
2.2.6.3.3	Qualitätskontrolle, Quantifizierung und Pooling der Library zur Vorbereitung der emPCR	75
2.2.6.3.4	Emulsions-PCR zur klonalen Amplifizierung	76
2.2.6.3.5	Sequenzierung und Datenanalyse	78
2.2.6.4	DBS mit dem Illumina MiSeq	79
2.2.6.4.1	PCR zur Amplikon-Generierung.....	80
2.2.6.4.2	Library Präparation und Adapter Ligation	81
2.2.6.4.3	Zweite PCR und Sequenzierung.....	84
2.2.6.4.4	Datenanalyse	86
3	Ergebnisse	87
3.1	Genomweite Methylierungsstudie mit dem Illumina Infinium HumanMethylation 450 K Array und anschließender Pyrosequenzierungs-Validierung.....	87
3.1.1	Workflow der Studie, Umfang und klinische Parameter der Untersuchungskohorten	87
3.1.2	Methylierungsarray-Screening.....	90
3.1.2.1	Globale Methylierung	90
3.1.2.2	Einzel-CpG Methylierung	92
3.1.2.3	pH-Gruppenvergleich im Microarray-Datensatz A	95
3.1.3	Validierung der Kandidaten-Gene mittels Pyrosequenzierung	96

3.1.3.1	Selektion der Kandidaten-Gene für die Validierung.....	97
3.1.3.2	Array Gruppen- und Subgruppenvergleich.....	97
3.1.3.3	Multivariate Regressionsanalyse	99
3.1.3.4	<i>ADAP1</i> -Validierung im pH-Gruppenvergleich.....	102
3.2	DBS-Studie zur Hypermethylierung des nicht-geprägten Allels (HNA)	104
3.2.1	DBS mit dem Roche GS Junior	104
3.2.1.1	Run-Parameter und Methylierung (mit und ohne Allel-Separierung).....	104
3.2.1.2	Epimutationsraten	111
3.2.1.3	Vergleich zwischen somatischem Gewebe und Keimzellen	114
3.2.1.4	Expression	116
3.2.2	DBS mit dem Illumina MiSeq.....	118
3.2.3	GDM/Kontrollen Gruppenvergleich	127
4	Diskussion	133
4.1	Genomweite GDM-Studie zur Findung von Kandidaten-Genen	133
4.1.1	<i>Ad infinitum</i> Kreislauf ungünstiger GDM-Auswirkungen auf die nächste Generation	133
4.1.2	GDM-induzierte DNA-Methylierungsveränderungen	134
4.1.3	Bewertung des GDM-Array-Screenings und der Validierung der Kandidaten- Gene	135
4.1.4	Matching und Störfaktoren-Korrektur	136
4.1.5	I-GDM- versus D-GDM-Gruppenvergleich	137
4.1.6	Allgemeine GDM-Einstellung und HbA1C	138
4.1.7	Kandidaten-Gene	139
4.2	DBS-Studie zur Hypermethylierung des nicht-geprägten Allels (HNA)	143
4.2.1	DBS zur Analyse geprägter Gene.....	143
4.2.2	Die Hypermethylierung des nicht-geprägten Allels (HNA)	145
4.2.3	HNA in geprägten Genen	149
4.2.4	Metastabile Epiallele (ME) und Entwicklungsprogrammierung	152
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	154
5	Referenzen	157
5.1	Literaturverzeichnis	157
5.2	Online Quellen für Abbildungen.....	175

6	Verzeichnisse.....	176
6.1	Abkürzungsverzeichnis	176
6.2	Abbildungsverzeichnis	184
6.3	Tabellenverzeichnis	185
7	Curriculum Vitae.....	186
8	Publikationen und Kongressbeiträge	188
8.1	Publikationen.....	188
8.2	Kongressbeiträge	189
9	Anhang.....	190

1 Einleitung

1.1 Epigenetik

Als Teildisziplin der Biologie beschäftigt sich die Genetik mit der Weitergabe von Erbinformationen. Der Mensch steht dabei im wissenschaftlichen Fokus der Humangenetik, einem interdisziplinären Feld bestehend aus molekularbiologischer Forschung und medizinischer Diagnostik. Klassischer Schwerpunkt ist die Analyse der Desoxyribonukleinsäure (DNA), das Speichermedium der zellulären Information, deren Organisation in Gene und interagierende Gencluster untersucht wird. Mutationen und Veränderungen der DNA sind Ursprung einer Vielzahl von Krankheiten/Syndromen und können auch in die nächste Generation vererbt werden. Um phänotypische Ausprägungen nachzuvollziehen und vorhersagen zu können, ist die Analyse des Genotyps (DNA-Sequenz) und die Identifikation von Genfunktionen unabdingbar [1]. Darüber hinaus aber auch die Untersuchung zeitlicher, räumlicher und elternabhängiger Regulationsmechanismen der Genaktivität, dem erklärten Forschungsinhalt der Epigenetik.

„Epigenetik waren schon immer all die seltsamen und wundervollen Dinge, die sich durch die Genetik nicht erklären lassen.“ (Denise Barlow).

1.1.1 Epigenetische Modifizierungen

Conrad. H. Waddington verwendete 1942 erstmals den Begriff „Epigenetik“, zusammengesetzt aus den beiden Wörtern „Epi“ (griechisch: über, auf, oben) und „Genetik“ [2]. Als Epigenetik bezeichnet man allgemein die Studie vererbbarer Informationen, die auf Änderungen der Genregulation und der Genexpression ohne Änderung der Genstruktur zurückgehen [3, 4]. Das Epigenom beschreibt die Gesamtheit aller epigenetischen Zustände im Genom [5] und stellt eine zusätzliche „Informationsschicht auf der DNA-Sequenz“ dar, bei der über kovalente Modifikationen die sterische Zugänglichkeit der DNA für transkriptionelle bzw. repressive Vorgänge kontrolliert wird [6]. Epigenetische Markierungen spielen eine fundamentale Rolle in vielen natürlichen biologischen Prozessen, wie beispielsweise in der Stammzellentwicklung, Zellzyklus-Regulation oder der embryonalen Entwicklung. Sie sind darüber hinaus aber auch in die Onkogenese und

Entstehung zahlreicher anderer Krankheiten involviert [6, 7]. Weitere typische epigenetische Phänomene sind die genomische Prägung sowie die X-Chromosom Inaktivierung (XIC) [6, 8], bei der jeweils ein elterliches Allel respektive ein X-Chromosom stillgelegt wird. Jede somatische Zelle ist genetisch mit demselben diploiden Genom ausgestattet, trotzdem unterscheiden sich verschiedene Gewebe- und Zelltypen deutlich voneinander. Während der Zelldifferenzierung wird über das epigenetische Profil bestimmt, welches Genset gewebe- und entwicklungsspezifisch aktiviert wird [9], sodass in vollständig differenzierten Körperzellen 90 - 95 % der Gene epigenetisch stillgelegt und nur 5 – 10 % exprimiert werden [10]. Analog zu dem Begriff Mutation in der Genetik, werden in der Epigenetik vom Normalzustand abweichende (potenziell reversible) Modifikationen als Epimutationen bezeichnet. Diese bleiben über somatische Zellteilungen hinweg stabil [11] und können auch generationsübergreifend weitergegeben werden [12-14]. Die Epimutationsrate ist im Vergleich zur DNA-Sequenzmutationsrate allerdings deutlich erhöht [15, 16]. Zahlreiche Studien belegen auch, dass das Epigenom von Umwelteinflüssen verändert wird [6, 17-19]. Diese flexible Anpassungsfähigkeit des Epigenoms bezeichnet man als epigenetische Plastizität. Sie stellt eine Art zelluläres Gedächtnis der Entwicklungsgeschichte dar [20]. Bekannte Umweltfaktoren, die sich epigenetisch auswirken, sind z. B. Sport, Rauchen, Ernährung sowie allgemeine Lebensgewohnheiten. Dies manifestiert sich auch bei monozygoten Zwillingen, die sich bei unterschiedlicher Lebensführung mit zunehmendem Alter auch phänotypisch immer stärker unterscheiden [21, 22]. Der Einfluss von Epimutationen auf die Entstehung verschiedenster Krankheiten, aber auch auf die phänotypische Variation innerhalb der gesunden Population, wird derzeit noch weitgehend unterschätzt [16, 23]. Die Epigenetik als solche basiert demnach auf den Grundlagen der Humangenetik, kombiniert in sich jedoch zusätzliche Disziplinen wie z. B. Umweltforschung oder Evolutionslehre und geht damit über die klassische konventionelle Genetik hinaus [9]. Sie bietet deshalb vielschichtige und differenzierte Interpretationsmodelle für die Untersuchung innovativer Fragestellungen.

Epigenetische Genaktivitätsmuster werden durch biochemische Modifikationen vermittelt, die die Chromatin-Struktur, die Zugänglichkeit der DNA, Ribonukleinsäure (RNA) oder die Bindung von regulatorisch aktiven Proteinen bzw. microRNAs an die DNA beeinflussen. Zwei Modifikationen sind dabei aufgrund ihrer funktionellen Relevanz besonders hervorzuheben, die DNA-Methylierung und Histonmodifizierungen. Es gibt jedoch darüber hinaus noch

weitere epigenetische Mechanismen, wie beispielsweise Prione, Polycomb-Mechanismen, RNA-Interferenz (RNAi) oder Chromosomen-Positionseffekte [6], auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll.

1.1.2 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung ist die derzeit am umfassendsten untersuchte epigenetische Modifikation der DNA [24]. Sie hat eine komplexe, nicht vollständig verstandene Evolutionsgeschichte durchlaufen, sich in Säugetieren, Pflanzen und einigen (nicht allen) Pilzen etabliert. Ebenso in manchen Insekten z.B. in der Honigbiene *Apis mellifera*. Für andere Insekten wie z.B. die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wird die Existenz von Cytosinmethylierung immer noch kontrovers diskutiert und gibt einige Rätsel auf [25-27]. Prokaryoten verwenden DNA-Methylierung, um ihre eigene DNA von invasiver Fremd-DNA unterscheidbar zu machen und vor einem Abbau durch Restriktionsnukleasen zu schützen. Dabei handelt es sich um einem Immunsystem ähnlichen Mechanismus, mit dem parasitäre virale DNA unschädlich gemacht wird, bevor es zum Einbau in die zelleigene DNA kommen kann. Auch in Eukaryoten dient sie der Kontrolle und Suppression mobiler Sequenzabschnitte und Retrotransposons, die beim Menschen hauptsächlich in nicht kodierenden Regionen vorkommen und schätzungsweise zwischen 40 % und 65 % des Genoms ausmachen [28-30]. In Vertebraten kommt DNA-Methylierung jedoch genomweit vor, in Promotoren, transposablen mobilen Elementen, kodierenden Regionen sowie intergenischen Regionen [26].

Als DNA-Methylierung bezeichnet man charakteristischerweise die kovalente Anheftung von Methylgruppen an Cytosine innerhalb von Cytosin-phosphatidyl-Guanin (CpG)-Dinukleotiden, wenn in der DNA-Sequenz ein Guanin in 3'-Richtung direkt auf ein Cytosin folgt [26, 31]. Das „p“ symbolisiert die Phosphodiesterbindung zwischen den aufeinanderfolgenden Basen. In Oozyten, Gehirn und embryonalen Stammzellen wurde Cytosinmethylierung auch schon an nicht-CpG Stellen gefunden (vorwiegend als CpA Methylierung) [32-34]. Sie ist jedoch viel seltener als die CpG-Methylierung [26]. Wieso nicht-CpG Methylierung gerade in diesen drei Geweben vorkommt, welche funktionelle Rolle sie hat und warum sie häufig während der Entwicklung verloren geht (ausgenommen

im Gehirn), ist derzeit nicht bekannt. DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysieren den Transfer einer Methylgruppe (CH_3) vom Methylgruppendonor S-Adenosylmethionin (SAM- CH_3) auf das fünfte Kohlenstoffatom (5mC) eines Cytosin-Pyrimidinrings [35]. DNMT1 hält die Methylierung von Genen bei Reparaturvorgängen und über die Zellteilung hinweg stabil und ist die häufigste DNA-Methyltransferase [36]. Im Zuge der Replikation erkennt DNMT1 hemimethylierte Doppelstränge und kopiert palindromisch die Methylierung des Originalstranges auf den noch vollständig unmethylierten, neu synthetisierten Strang [37, 38]. Methylierungsmuster werden auf diesem Weg über die Mitose an die Tochterzellen weitergegeben [39]. DNMT3A, DNMT3B und deren katalytisch inaktiver Cofaktor DNMT3-Like (DNMT3L) sind dagegen in *de novo* Methylierungsprozesse involviert [40-43]. Methyl-CpG binding Proteine (MBPs) binden an doppelsträngige DNA mit symmetrisch methylierten CpGs [44] und rekrutieren Chromatin Remodelierungskomplexe für die Gen-Repression (z.B. Histon-Deacetylasen (HDACs) oder Histon-Methyltransferasen (HMTs)) [38, 45].

Interessanterweise kommen CpG-Stellen mit nur 1 % (statt den statistisch erwarteten 5 %) genomweit seltener vor, als die anderen 15 möglichen Dinukleotide und zeigen hohe Mutationsraten zu CpA oder TpG (C>T Transitionsmutation) [46, 47]. CpG-Stellen treten gehäuft in CpG-Inseln (CGIs) auf, 0,5 - 2 kb lange Regionen mit einer 10 – 20 mal höheren statistischen CpG-Dichte (ca. 5 – 10 CpGs pro 100 Basen) verglichen mit anderen Bereichen des Genoms und einem um 20 % erhöhten GC-Gehalt (GC-Gehalt in CpG-Inseln: > 60 %, im restlichen Genom: 40 %) [26, 48-50]. Zwischen der Cytosinmethylierung und der CpG-Dichte herrscht eine inverse Korrelation. CpG-arme Regionen, die den größten Teil des Genoms ausmachen, sind durch hohe Methylierungslevel charakterisiert, während CGIs meistens unmethyliert sind [34]. Insgesamt sind in Säugetieren ungefähr 80 % aller CpG-Stellen methyliert und 20 % unmethyliert. Unmethylierte CpGs akkumulieren (als CGIs) in 60 - 70 % aller Promotorregionen und transcription start sites (TSS) von Genen, sind häufig mit Transkriptionsfaktorbindestellen assoziiert und erlauben deren Expression [6, 48, 51]. Der DNA-Methylierungsstatus in Promotorregionen geht außerdem mit posttranslationalen Histonmodifikationen einher, die den Kondensierungsgrad des Chromatins bestimmen (methyliert: lokal kondensiert, inaktiv; unmethyliert: lokal dekondensiert, aktiv) [9, 41, 49]. Eine Promotor-Methylierung führt über eine kompaktere Chromatinstruktur, durch die die Transkription sterisch blockiert wird, zur Inaktivierung des dazugehörigen Gens, ein nicht methylierter Promotor ermöglicht dagegen die Genexpression [9, 47, 52, 53]. DNA-

Methylgruppen verhindern die Bindung der RNA-Polymerase und des Transkriptions-initiationskomplexes und begünstigen die Bindung von Transkriptionsrepressoren [54]. Anders als in Promotorregionen ist Cytosinmethylierung im Genkörper normalerweise mit aktiven Genen assoziiert, in alternatives Splicing involviert und eines der Kriterien für die Exondefinition [31, 50]. Die DNA-Methylierung ist daher als regulatorische Markierung zu sehen. Viele Krankheiten und besonders alle verschiedenen Krebstypen sind mit aberranten DNA-Methylierungsprofilen wie genomweiter Hypomethylierung und Tumorsuppressor-Hypermethylierung assoziiert [55, 56]. In einigen Fällen ist aber auch die Funktionsfähigkeit beteiligter Enzyme gestört, in Leukämie wurden z.B. Mutationen in DNMT3A festgestellt [57].

In dieser Arbeit wurden ausschließlich DNA-Methylierungsuntersuchungen durchgeführt, genomweit mit Illumina Infinium 450K Methylierungsarrays und auf Amplikonebene mittels Pyrosequenzierung bzw. Next Generation Sequencing (NGS) basierendem Deep Bisulfite Sequencing (DBS). Der am zweitbesten untersuchte epigenetische Mechanismus, der hier ebenfalls eine kurze Erwähnung finden soll, ist die Histonmodifikation.

1.1.3 Histonmodifikationen

Als Verpackungskomponenten des Erbmateriels fungieren Histone wie eine Art Gerüst für zelluläre Prozesse, wie Replikation, DNA-Reparatur oder Transkription [58, 59]. Posttranslationale Modifizierungen der Histonproteine innerhalb regulatorischer Genregionen verändern über den Kondensierungsgrad des Chromatins die Zugänglichkeit der DNA für die Transkriptionsmaschinerie [60, 61]. Der sogenannte Histon-Code, eine Kombination diverser chemischer Modifizierungen der Nukleosomen und Histonschwänze, legt die jeweilige Chromatinstruktur fest [62, 63]. Bisher wurden mindestens acht verschiedene Histonmodifizierungen gefunden: Methylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung, Sumorylierung, Phosphorylierung, ADP-Ribosylierung, Deiminierung und Prolin-Isomerisierung [59, 62, 64, 65], von denen Methylierung sowie Acetylierung bisher am besten verstanden und beschrieben sind. Cytosinmethylierung und Histonmodifikationen wechselwirken miteinander [66, 67]. Histonacetylierungen sind mit unmethylierter DNA assoziiert [68], erhöhen den Dekondensierungsgrad des Chromatins und steigern damit die

Genaktivität. Histon-Acetyltransferasen (HATs) katalysieren den Transfer von Acetylgruppen aus Acetyl-CoA Cofaktoren auf die Lysin- ϵ -Aminogruppe eines N-terminalen Histon-Endes [69] und neutralisieren damit die Ladung des Lysins, wodurch die DNA-Histon Bindung etwas gelockert wird [59]. Histonmethylierungen können antagonistische Auswirkungen auf die Gentranskription haben, je nachdem welche Histon-Aminosäure methyliert wird und wie viele Methylgruppen angehängt werden [67, 68]. Eine H3K4me3 Trimethylierung ist ein Aktivierungssignal, während eine H3K9me2 Dimethylierung ein Gen-Stillegung induziert [70].

1.2 Prinzip der genomischen Prägung

Die genomische Prägung (*engl.* „Imprinting“) ist ein epigenetisches Phänomen, bei dem sich die Expression monoallelisch und elternspezifisch manifestiert. Für geprägte Gene liegt nur ein Allel (mütterlich oder väterlich) aktiv vor, das andere Allel ist entsprechend inaktiviert („parent-of-origin Regulation“) [71-73]. Die beiden parental Allele unterscheiden sich aber nicht in ihrer Sequenz, sondern in der DNA-Methylierung, in Chromatin-Modifikationen, dem Histon-Code und Antisense Transkripten [31, 74]. CTCF-Insulatorelemente und nicht kodierende RNAs (ncRNAs) spielen ebenfalls eine Rolle bei der Steuerung der Genexpression von geprägten Genen [75]. Nur für 6 - 10 % aller Gene (Geschlechtschromosomen ausgeschlossen) ist eine monoallelische Expression bekannt [76]. Welche der beiden elterlichen Kopien dabei stillgelegt und welche abgelesen wird, entscheidet sich zumeist zufällig und variiert innerhalb der Zellen eines Gewebes. Nur in 100 – 200 geprägten Genen liegt eine klare epigenetische Asymmetrie der elterlichen Prägungsmuster vor (www.otago.ac.nz/IGC) [77, 78]. Prägung kann sich auch auf spezielle Gewebe oder limitierte Entwicklungs-Zeiträume beschränken, besonders wichtig ist sie jedoch in der pränatalen und frühen postnatalen Phase [79]. Das erste geprägte Gen wurde vor 25 Jahren in der Maus entdeckt und war der maternal exprimierte insulin-like growth factor 2 Rezeptor (*IGF2R*). Dieser kodiert zusammen mit seinem paternal exprimierten Liganden insulin-like growth factor 2 (*IGF2*) für einen fetalen Wachstumsfaktor [80, 81]. Die maternal exprimierte, untranslatierte RNA *H19* ist funktionell ebenfalls an *IGF2* gekoppelt [82]. Geprägte Loci sind über das gesamte Genom verteilt, das X-Chromosom mit eingeschlossen [75, 83]. Sie können einzeln oder gepaart vorkommen und werden dabei direkt über differenzielle Promotor-

Methylierung reguliert, die meisten (ca. 80 %) akkumulieren jedoch in ungefähr ein Megabasen großen, genomischen Clustern [42, 79, 84, 85]. Diese enthalten zumeist gegensätzlich geprägte Gene (maternal und paternal exprimiert) und sind oft auch mit nicht geprägten Genen durchsetzt (siehe Abbildung 1). Insgesamt umfassen solche geprägten Cluster meist drei bis zwölf verschiedene Gene. Die Mehrheit der Gene kodiert dabei Proteine, wenigstens ein Gen kodiert jedoch eine lange, regulierende ncRNA [86]. Aufgrund der geschlechtsabhängigen, allelspezifischen Methylierung bezeichnet man geprägte Loci als differenziell methylierte Regionen (DMRs) bzw. differenziell methylierte Domänen (DMDs). DMRs weisen charakteristischerweise eine erhöhte CpG-Dinukleotid-Dichte auf. Über die DNA-Methylierungsmarkierungen solcher Regionen, also das eigentliche „Imprint“, kann auf die parentale Allel-Herkunft geschlossen werden [87]. Wird die DNA-Methylierung bereits in der Keimbahn festgelegt, bezeichnet man die Region als primäre gametische DMR (gDMR). Sekundäre somatische DMRs (sDMRs) erhalten ihr Imprinting dagegen erst nach der Befruchtung. gDMRs können als *cis*-regulierende Imprinting Kontrollregionen (ICRs) über große Distanzen die elternspezifische Expression von geprägten Genen steuern. Darüber hinaus sind sie auch wichtig bei der Etablierung von Prägungsprofilen der sDMRs [85, 88, 89]. Mehrere Studien belegen, dass durch eine Deletion der ICR auch die Expression der von ihr kontrollierten Gene verloren geht [83, 90-92]. Interessanterweise sind maternal geprägte (paternal exprimierte) DMRs/ICRs häufig in Promotor-Regionen lokalisiert und regulieren dort unmittelbar die Transkription des entsprechenden Gens. Paternal geprägte (maternal exprimierte) DMRs/ICRs kommen dagegen häufiger in intergenischen Regionen (IG) vor und steuern die Aktivität von mehreren (teilweise invers geprägten) Genen über kompliziertere Netzwerkinteraktionen [85].

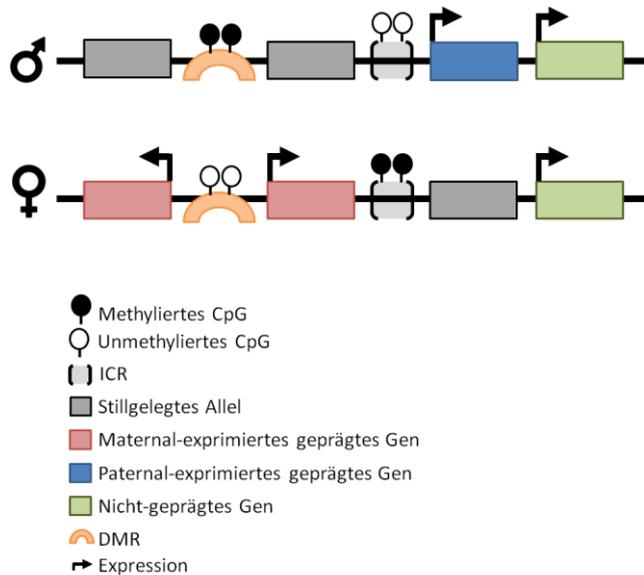


Abbildung 1: Beispiel eines geprägten Genclusters

Dargestellt ist das mütterliche (oben) und das väterliche Allel (unten) eines geprägten Genclusters mit dem Expressionsmuster für nicht geprägte Gene (grün), mütterlich exprimierte (rot) sowie väterlich geprägte Gene (blau). Nicht geprägte Gene können in der Mitte oder angrenzend an geprägte Gencluster vorkommen. Die ICR kontrolliert das Prägungsprofil mehrerer Gene in der Region, deshalb können sich Aberrationen in dieser Region ebenfalls auf die Aktivität der kontrollierten Gene auswirken. Neben den ICRs gibt es auch (sekundäre) DMRs die von ICRs kontrolliert werden. Eine weitere wichtige Rolle wird außerdem ncRNAs und Insulatorelementen zugeschrieben, die hier nicht gezeigt sind.

DMR: differentially methylated region; ncRNA: non-coding RNA; ICR: imprinting control region. Abbildung angelehnt an Bartolomei 2009 [75].

1.2.1 Epigenetische Genomreprogrammierung

Prägungsprofile von DMRs werden nicht nach den klassischen Mendelschen Regeln vererbt [93] und stellen reversible Modifikationen dar. Die zyklischen Phasen der Prägungs-Etablierung, -Aufrechterhaltung und -Löschung werden als epigenetische Methylierungsreprogrammierung bezeichnet und können in zwei globale De- und Remethylierungsprozesse unterteilt werden. Da die epigenetische Genomreprogrammierung in der Gametogenese und Embryogenese stattfindet, stammen die meisten Forschungsdaten dazu von Maus-Modell-Studien. Die erste Demethylierungswelle findet in primordialen Keimzellen (PGCs) statt, die zweite unmittelbar nach der Befruchtung im sich entwickelnden Embryo (Präimplantationsphase) (Abbildung 2). Für jede neue Generation Nachkommen werden alle Methylierungsprofile in der Keimbahn vollständig ausgelöscht [84] und geschlechtsabhängig während der männlichen bzw. weiblichen Gametogenese neu etabliert (primäre gDMRs) [94-96], bzw. nach der Befruchtung während der Embryogenese eingeführt

(sekundäre sDMRs) [97-99]. Somit sind männliches und weibliches Genom kurzzeitig epigenetisch äquivalent, bevor die Methylierungsmuster auf die Interessen des jeweiligen Geschlechtes abgestimmt werden [100-102]. In der Präimplantationsentwicklung findet direkt nach der Befruchtung die zweite Demethylierung statt. Dabei werden fast alle in der Keimbahn etablierten Methylierungsmuster erneut entfernt und ein somatisches, zell-spezifisches Profil eingeführt [26, 96, 103]. Dieses wird fortan (über Zellteilungen hinweg) an die Tochterzellen weitergegeben. Über die Umprogrammierung der beiden Keimbahngenome zu einem diploiden, somatischen Genom wird Totipotenz erreicht und eine korrekte Entwicklung des Embryos möglich gemacht [104]. Die geprägten Gene und einige transposable Elemente (TEs) entgehen dieser zweiten, postzygotischen Methylierungsreprogrammierung [75, 102, 105]. Das elternspezifische Methylierungsmuster der Keimbahn wird in ihnen erhalten und resultiert in einer allelspezifischen Expression, da nach dem Blastozysten-Stadium die etablierten Methylierungsprofile in den meisten Fällen ein Leben lang aufrechterhalten werden. Man vermutet, dass die epigenetische Reprogrammierung die Weitergabe von im Laufe des Lebens akkumulierten, epigenetischen Mutationen an die nächsten Generationen unterbinden soll [95, 106].

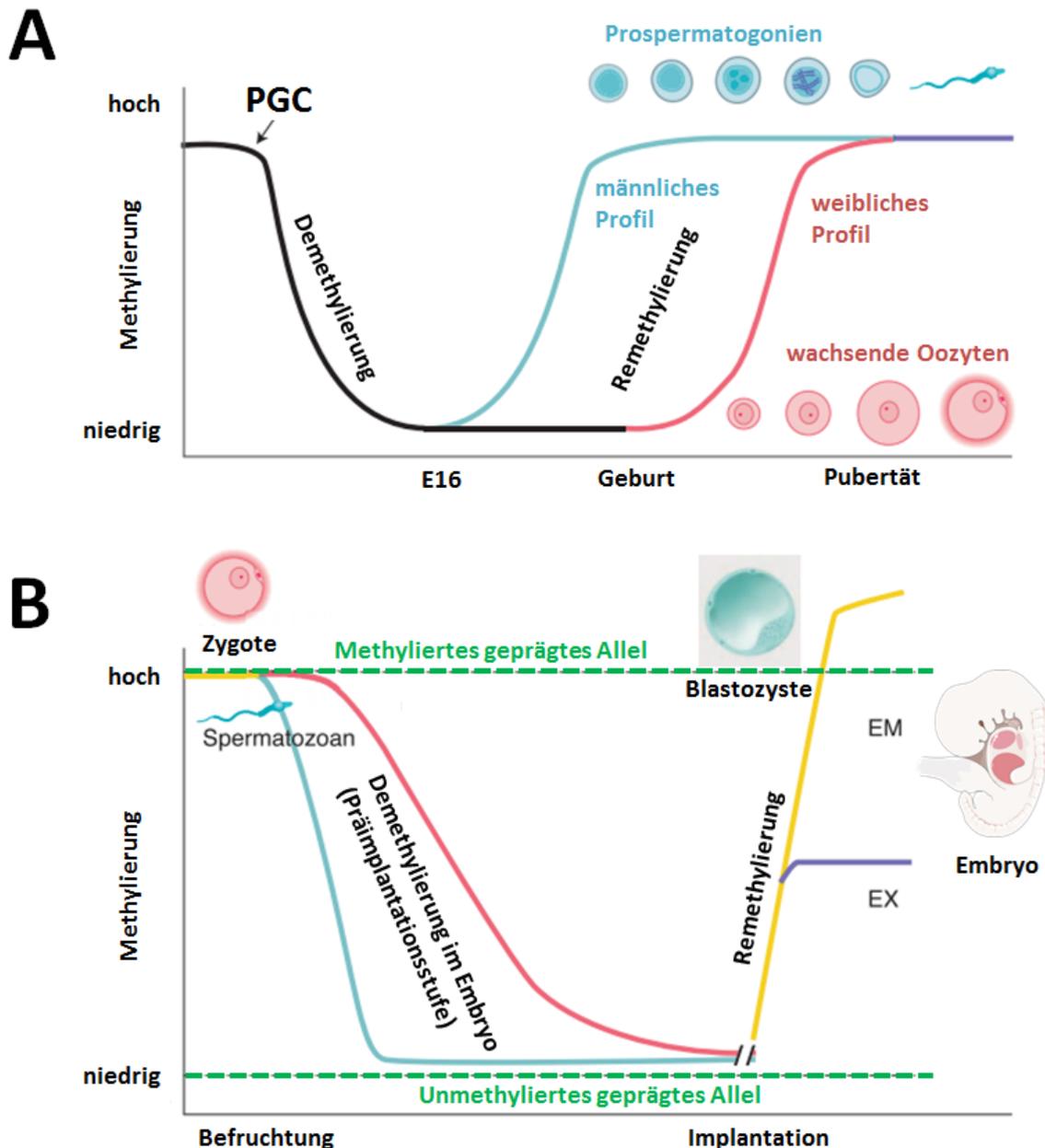


Abbildung 2: Methylierungsreprogrammierung in der Keimbahn und im Präimplantationsembryo (Maus)

A) Erste genomweite Demethylierungswelle in der Keimbahn

Elterliche somatische Methylierungsmuster werden in den PGCs ausgelöscht und nach geschlechtsspezifischen Mustern *de novo* etabliert. Dabei wird das männliche Profil (blau) in den Prospermatogonien bereits ab dem Embryotag 16 etabliert (pränatal), das weibliche Profil (rot) dagegen erst in den sich entwickelnden Oozyten nach der Geburt (postnatal).

B) Zweite Demethylierungswelle im Präimplantationsembryo

Nach der Fertilisation wird das paternale Genom aktiv demethyliert. Das maternale Genom wird über einen etwas langsameren, passiven Prozess (DNA Replikation und Zellteilung) demethyliert. Die Remethylierung findet nach der Implantation in die embryonische und die extraembryonische Entwicklungslinie statt. Geprägte Gene (grün) entgehen dieser zweiten Methylierungsreprogrammierung und behalten den nach der ersten Demethylierungswelle etablierten allelspezifischen Status bei.

E16: embryonic day 16; EM: embryonische Entwicklungslinie; EX: extraembryonische Entwicklungslinie; PGC: primordiale Keimzellen. Abbildung entnommen aus Reik et al., 2001 [24] und modifiziert.

1.2.2 Entstehungstheorien und Funktion von geprägten Genen

Die genomische Prägung ist zwar auch in einigen Insektenarten und Blütenpflanzen (z.B. Arabidopsis) bekannt, kommt aber sonst fast nur in höheren Säugetieren (Eutheria) und einigen Beuteltieren vor (Marsupialia) [84, 107, 108]. Eierlegende Säugetiere wie z.B. das Schnabeltier sind davon ausgeschlossen. Innerhalb der Säugetiere entstand das Imprinting vor rund 180 - 210 Millionen Jahren und trat zum ersten Mal bei den letzten gemeinsamen Vorfahren der Menschen, Beuteltiere und Kloakentiere auf [105, 109]. Der evolutionäre Grund für die Ausbildung der genomischen Prägung ist bis heute ungeklärt. Man nimmt an, dass sich die genomische Prägung zusammen mit dem Taxon Eutheria entwickelt hat und auf die kindliche Versorgung mit mütterlichen Nährstoffen über die Plazenta zurückzuführen ist [110]. Zwischen verschiedenen Säugetierarten ist die Prägung weitgehend homolog und auch die meisten Regulationsmechanismen sind konserviert, es gibt aber auch Ausnahmen von der Regel. Liegt ein Gen z.B. in der Maus geprägt vor, muss dasselbe Gen im Menschen nicht zwingend auch geprägt sein [85]. Einige Thesen versuchen die evolutionäre Entstehung der genomischen Prägung zu erklären, zu ihnen gehören die „kinship“ Theorie, die „sexual antagonism“ Theorie oder die „maternal-offspring coadaptation“ Theorie [93, 111]. Das wahrscheinlichste Erklärungsmodell ist aber die „intergenomische elterliche Konflikt Hypothese“ (auch „Geschlechterkonflikthypothese“ genannt) die annimmt, dass sich das Imprinting als Regulationsmechanismus zur Verteilung mütterlicher Ressourcen an die Nachkommenschaft entwickelt hat. Die Theorie dahinter wurde 1991 erstmals von Moore und Graham bzw. Haig und Graham postuliert [100, 112]. Sie besagt, dass die selektive Expressions-Asymmetrie deshalb aufgebaut wurde, um antagonistische mütterliche und väterliche Interessen während der prä- und postnatalen Entwicklung zu vertreten. Mütterlich exprimierte (väterlich geprägte) Gene wie z.B. *H19*, *IGFR2*, *GNAS* oder *GRB10* wirken auf den Fetus eher wachstumshemmend, während väterlich exprimierte (mütterlich geprägte) Gene wie z.B. *DLK1*, *IGF2*, *PEG1* oder *PEG3* das embryonale Wachstum steigern und mütterliche Wachstumsinhibitoren inaktivieren [112-114]. Über unterschiedliche Sets geprägter Gene wird das intrauterine embryonale Wachstum demnach in einer kompetitiven Art und Weise von den elterlichen Genomen gesteuert. Die Menge und der Umfang des Nährstoffangebots, das die Mutter ihrem Kind offeriert, ist dabei entscheidend für dessen Größe und Überlebenschance. Eine hohe Ressourcennachfrage des Kindes erhöht aber auch die Kosten für die Mutter (möglicherweise zulasten zukünftiger Schwangerschaften) und

wird deshalb von dieser streng kontrolliert [100, 115]. Imprinting stellt folglich wahrscheinlich ein kontrolliertes Konkurrenzsystem dar, wie es in dieser Form nur in Säugetieren vorkommt, resultierend aus der intensiven, pränatalen Versorgung des Embryos durch die Mutter. Auch nach der Geburt besteht in der Stillphase noch ein erhöhter kindlicher Bedarf an die mütterliche Versorgung mit Milch, weshalb die genomische Prägung auch postnatal bestehen bleibt. Manche geprägten Gene (wie z.B. *PEG3*) beeinflussen darüber hinaus auch das mütterliche Brutpflegeverhalten. Die meisten geprägten Gene sind jedoch in fetale und plazentale Wachstumsvorgänge, in die allgemeine Gewebedifferenzierung aber auch in die Gehirnentwicklung, neurologische Prozesse und in postnatales Reaktionsverhalten auf neue Umgebungsbedingungen involviert [101, 110, 114, 116-118]. Einige spielen darüber hinaus auch eine Rolle im adulten Metabolismus und sind mit Adipositas assoziiert [119]. Funktionell betrachtet sind geprägte Gene haploid und aus diesem Grund besonders anfällig für Mutationen und epigenetische Fehlregulationen [105]. Ein zweites exprimiertes Allel, das die Gen-Dosis ggf. balancieren und für mehr genetische Diversität sorgen könnte, fehlt. Kommt es durch Fehlregulationen zu Änderungen der Gen-Dosis, kann das zu schwerwiegenden neurologischen Erkrankungen führen, aber auch Auswirkungen auf die Entwicklung spezieller Organe/Zelllinien und die pränatale Wachstumskontrolle haben [85] und zu Overgrowth-Syndromen wie z.B. Beckwith-Wiedemann (BWS) führen [120] (siehe Kapitel 1.2.3 Imprinting-Störungen auf Seite 17). Im Tumorgewebe geht das normale Prägungsmuster häufig verloren bzw. es treten Loss of Imprinting (LOI) Phänomene auf [121-123], sodass geprägten Genen auch Funktionen als Onkogene oder Tumorsuppressor-Gene zugesprochen werden [124, 125], was jedoch bisher nur unzureichend belegt ist. Als LOI bezeichnet man sowohl den Schwund als auch die Zunahme von DNA-Methylierung oder auch den Verlust der allel-spezifischen Expression [126]. In einigen Studien wurde auch ein Zusammenhang zwischen assistierenden Reproduktionstechniken (ART) wie die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) oder die In-vitro-Fertilisation (IVF) und abnormalen Prägungsmustern gefunden [19, 89, 127, 128]. Ob daraus auch erhöhte Risiken für Imprintingkrankheiten resultieren, ist jedoch noch nicht abschließend geklärt [127, 129-131]. Das meiste Wissen über aberrante Prägungsmuster bis hin zu schwerwiegenden Prägungs-Störungen wurde durch Genotyp-Phänotyp-Studien beim Menschen, sowie in Maus-Experimenten gewonnen [85]. Einige der bekanntesten und häufigsten Imprinting-Syndrome werden im Folgenden kurz vorgestellt.

1.2.3 Imprinting-Störungen

Solter und Surani führten in den 1980er Jahren Pronuklei-Transplantationsexperimente an Mäusen durch und beschrieben damit erstmalig Prägungseffekte im Säugergenom [132-134]. Entkernte Oozyten wurden dabei mit zwei verschiedenen männlichen Vorkernen (paternal uniparental) bzw. mit zwei verschiedenen weiblichen Vorkernen (maternal uniparental) ausgestattet (Abbildung 3) und die pränatale Entwicklung dieser artifiziell generierten, digynischen bzw. diandrischen Embryonen beobachtet. Es zeigte sich, dass Embryonen mit uniparentalen diploiden Genomen entgegen der Erwartung nicht überlebensfähig sind und sich nicht über ein frühes Postimplantationsstadium hinaus entwickelten [134]. Interessanterweise zeigte sich aber auch, dass die beiden elterlichen Genome in unterschiedlicher Weise zur Entwicklung beitragen, da zwischen digynischen und diandrischen Embryonen gravierende morphologische Unterschiede und charakteristische Trophoblasten-Anomalien auftraten. Aus diandrischen Zygoten entwickelten sich hydatiforme Molen, die plazentales aber kein embryonales Gewebe aufwiesen, die digynischen Zygoten bildeten hingegen überwiegend embryonales Gewebe aus, allerdings kaum extraembryonales Gewebe [85]. Daraus kann geschlossen werden, dass das maternale Genom eine besondere Rolle bei der Embryogenese spielt, während das paternale Genom wichtiger für die Differenzierung extraembryonaler Strukturen ist [133, 135]. Für eine normale Embryonalentwicklung ist demnach eine Kombination beider parental Genome unverzichtbar, da maternales und paternales Genom funktionell nicht äquivalent sind. Eine Parthenogenese (Jungferzeugung) ist aus diesem Grund in Säugern unmöglich [136].

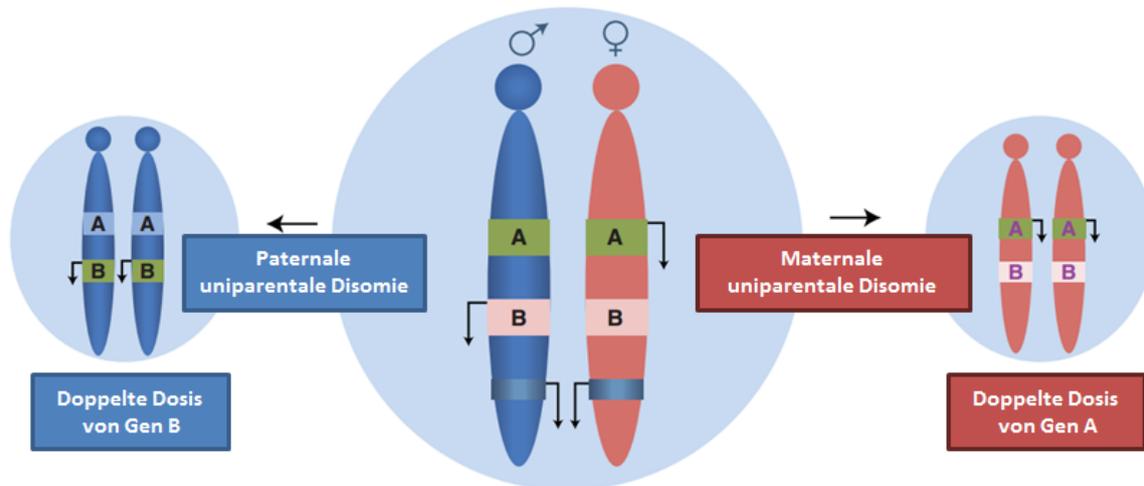


Abbildung 3: Auswirkungen uniparentaler Disomien auf die Gen-Dosis

Normalerweise enthalten diploide somatische Zellen einen mütterlichen (rot) und einen väterlichen (blau) Chromosomensatz. Gen A und B sind invers geprägte Gene: Gen A wird maternal exprimiert, Gen B paternal (Transkriptionspfeil). Bei uniparentalen Disomien fehlt jeweils eine balancierende elterliche Genkopie, resultierend in einer doppelt so hohen Gen-Dosis. Uniparentale Embryos wurden zur Identifikation geprägter Gene und deren Funktion herangezogen.

Abbildung entnommen aus Bartolomei and Ferguson-Smith, 2011 [85] und modifiziert.

Ist die genomische Prägung fehlerhaft reguliert, können daraus verschiedene schwerwiegende Krankheiten, sogenannte „Imprinting Disorders“ (IDs) resultieren [118, 127]. Imprinting-Krankheiten werden allgemein definiert als eine Gruppe seltener, angeborener Störungen, die durch Imprinting-Defekte hervorgerufen werden wie z.B. eine misslungene Prägungsetablierung bzw. Prägungsaufrechterhaltung während der beiden genomischen Reprogrammierungswellen (Kapitel 1.2.1 Epigenetische Genomreprogrammierung auf Seite 12) [114, 127]. Charakteristisch für IDs ist, dass die Imprinting-Muster geprägter Loci nicht paritätisch vererbt wurden und somit kein balanciertes Profil geschlechtsspezifischer elterlicher Muster vorliegt. Sie wirken sich lebenslang auf Wachstum, Entwicklung und Metabolismus der Betroffenen aus und haben darüber hinaus einen enormen Einfluss auf deren Lebensqualität. Betroffene zeigen häufig auffällige Größenwachstums-Anomalien, verschieden starke mentale Retardierungen und teilweise auch Krebserkrankungen im frühen Kindesalter. IDs sind derzeit die eindrucksvollsten und offensichtlichsten Beispiele für die Assoziation humaner Krankheiten mit dem epigenetischen Status [137]. Mit einer Inzidenz von ein bis zehn Fällen in 100.000 Kindern kommen IDs jedoch insgesamt vergleichsweise selten vor [131]. Gegensätzliche Imprinting-Defekte am selben Locus können dabei zu sehr unterschiedlichen Krankheits-

Phänotypen führen. Zu den bekanntesten Imprinting-Erkrankungen gehören u. a. das Prader-Willi Syndrom (PWS) und sein genetisches Gegenüber, das Angelman Syndrom (AS), die beide mit Genen auf Chromosom 15q11-q13 assoziiert sind [138-140]. Ebenso das Silver-Russell Syndrom (SRS) mit seinem Tandem, dem Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS), deren krankheitsassoziierten Gene auf Chromosom 11p15.5 angesiedelt sind [3, 141, 142]. Erstere Syndrome (PWS und AS) werden hauptsächlich als Störungen der Neuronalentwicklung angesehen, während Zweitere (SRS und BWS) mit übermäßigem bzw. gehemmtem fetalen Wachstum assoziiert sind [143]. Außerdem zählt man zu den Imprinting-Störungen das maternale und paternale UPD14-Syndrom, den Pseudohypoparathyreoidismus 1b (PHP-1b), sowie den transienten neonatalen Diabetes mellitus Typ 1 (TNDM1) [85, 89, 114, 144] (siehe Abbildung 4). Neben den epigenetischen Defekten (wie z. B. fehlerhaften DNA Hypo- und Hypermethylierungen oder Histonmodifikationen), können Imprinting-Krankheiten aber auch von genetischen Defekten hervorgerufen werden. Zu den genetischen Ursachen gehören uniparentale Disomien (UPDs), bei denen für ein Chromosom oder für eine chromosomale Region eine elterliche Kopie verloren geht bzw. disom vom selben Elternteil vorliegt und beide Exemplare die gleiche elternspezifische Prägung aufweisen. Außerdem zählen zu den genetischen Ursachen auch DNA-Mutationen in ICRs und geprägten Genen, sowie große Deletionen bzw. Duplikationen, Translokationen und Inversionen geprägter Loci [85, 89, 127], die die vorhandene Gen-Dosis verändern. Die häufigsten Gründe für IDs scheinen UPDs durch Rescue-Vorgänge in der Zygote zu sein. Bei einem Monosomie-Rescue wird ein Chromosom dupliziert, bei einem Trisomie-Rescue ein überzähliges Chromosom entfernt [145].

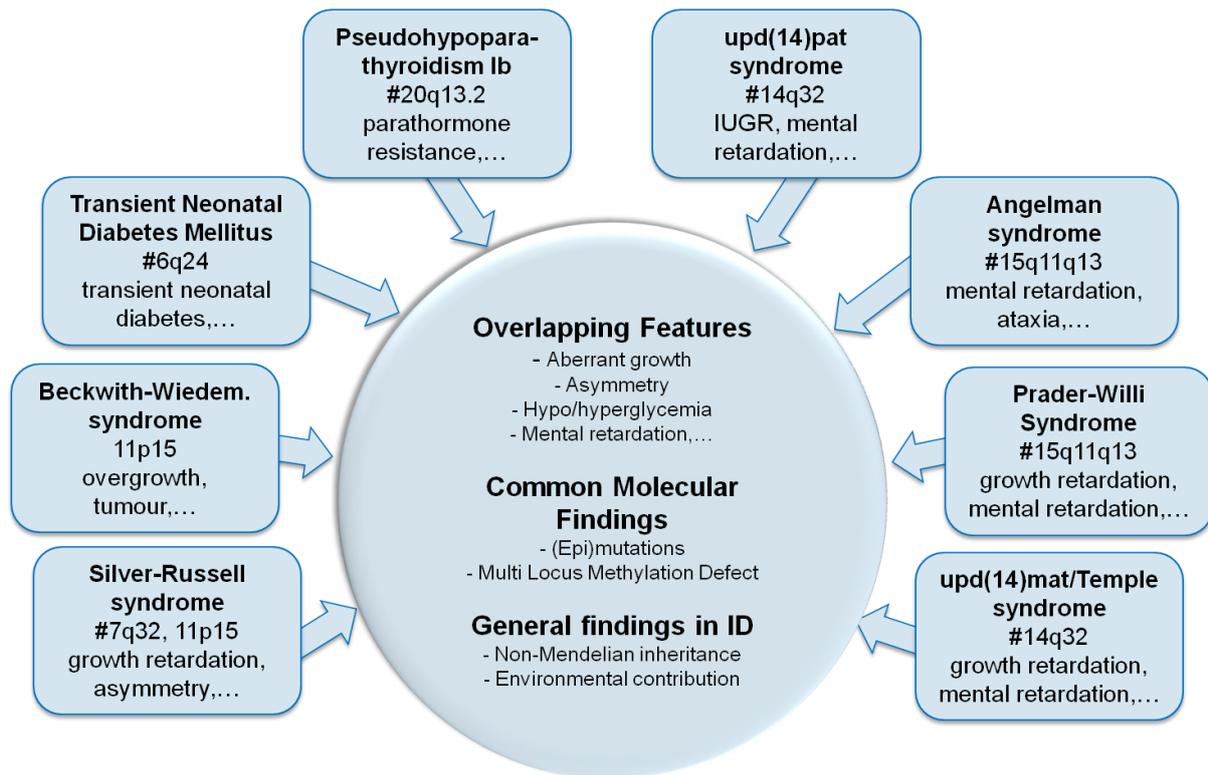


Abbildung 4: Klinische Phänotypen und Gemeinsamkeiten aller Imprinting-Syndrome

Hauptcharakterisierungsmerkmale der acht bisher bekannten IDs und Lokalisierung der betroffenen Gene. Klassifizierung überlappender Eigenschaften und genereller Gemeinsamkeiten der verschiedenen Syndrome.

Abbildung entnommen von: <http://www.imprinting-disorders.eu/?p=2373>.

1.2.3.1 Der Prader-Willi (PWS)/Angelman Syndrom (AS) Genlokus

Die bekanntesten und am besten untersuchten menschlichen IDs sind PWS und AS. In beiden Krankheits-Phänotypen ist das *SNRPN-UBE3A* Cluster betroffen, das eine Vielzahl an geprägten Genen enthält und komplexen Regulations-Mechanismen unterliegt [139]. Daher können unterschiedlichste Fehlregulationen zu den PWS/AS-Phänotypen führen, die hier nur ansatzweise erklärt werden sollen. Zur Krankheits-Diagnose werden derzeit vor allem DNA-Methylierungsuntersuchungen des *SNURF-SNRPN* Locus durchgeführt. Gesunde Individuen zeigen ein intermediäres Methylierungsprofil (50 %), während sich für PWS-Patienten nur das maternale methylierte, für AS-Patienten dagegen nur das paternale unmethylierte Allel identifizieren lässt [146].

AS kommt mit einer Inzidenz von 1:15.000 bis 1:16.000 Geburten vor und geht typischerweise mit mentaler Retardierung, Mikrozephalie und schweren motorischen Entwicklungsverzögerung einher [138, 146, 147]. Man bezeichnet AS auch als „Happy Puppet

Syndrome“, da die Patienten häufig (unmotiviert) lachen, sich hyperaktiv ataktisch bewegen und trotz reduzierter Laut- bzw. Sprachentwicklung einen glücklichen Eindruck machen [148]. AS-Kinder leiden häufig unter Schlafstörungen und Epilepsie. Die Lebenserwartung von Betroffenen ist jedoch im Allgemeinen nicht verkürzt. AS kann durch vier molekulare Mechanismen entstehen. Imprinting-Defekte in 15q11 - q13, die die Expression des *UBE3A* Gens beeinflussen (3 – 5 % der Fälle), sind die seltenste Ursache, gefolgt von (3 – 5 %) paternalen UPDs [upd(15)pat] und intragenischen Mutationen im *UBE3A* Gen (10 – 20 %). Am häufigsten geht die Krankheit jedoch auf *de novo* Deletionen im AS-Lokus zurück (70 – 80 %). In allen AS-Fällen fehlt eine intakte maternale *UBE3A*-Kopie [147].

PWS findet man in ungefähr 1:17.500 aller Kinder. Charakteristische Merkmale sind geringes Geburtsgewicht und Trinkschwäche im ersten Lebensjahr, gefolgt von starker kindlicher Adipositas bei minderwüchsiger Gedeih-Störung aufgrund von Hyperphargie. Außerdem typische Kennzeichen sind Muskelhypotonie bei Neugeborenen, Hypogonadismus, hypothalamischen Dysfunktionen, sowie intellektuelle Entwicklungsverzögerungen (milde bis moderate mentale Retardierung) und kognitiven Schwächen [149]. Übergewichtsbedingte Folgeerkrankungen wie Diabetes mellitus reduzieren die Lebenserwartung von Betroffenen im Vergleich zu Gesunden. Im *SNRPN-UBE3A*-Lokus befinden sich neben den maternal exprimierten AS-Genen auch eine Reihe snoRNA Gene und paternal exprimierter PWS-Gene. PWS entsteht, wenn deren Genexpression fehlt, speziell wenn die *SNORD116* Transkription betroffen ist (durch 4-6 Mb Deletionen (70 %), maternale UPDs (25 - 30 %) [upd(15)mat] oder Imprinting-Fehler (1 %)) [138, 149].

1.2.3.2 Der Silver-Rusell (SRS)/Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS) Genlokus

Wie PWS und AS zeigen auch BWS und SRS ein gegensätzliches klinisches und (epi)genetisches Zusammenspiel. Am häufigsten betroffen sind dabei Gene in geprägten Clustern auf Chromosom 11p15.

BWS ist mit einer Inzidenz von 1:13.700 [150] sehr selten. Die klinischen Merkmale sind übermäßiges intrauterines und postnatales Wachstum, neonatale Hypoglykämie, Makrosomie, Makroglossie, ein erhöhtes Risiko (5 %) für embryonale Nieren-Tumore (Wilms Tumor) und Lebertumore (Hepatoblastome). Die Penetranz von BWS ist sehr variabel. Milde

Ausprägungen bleiben zum Teil klinisch unauffällig. Die Betroffenen entwickeln eine normale Intelligenz [127]. Bei BWS-Patienten betreffen die Prägungs-Defekte das maternale Allel einer oder zweier ICRs auf Chromosom 11p15. Zwischen 2 und 7 % der Fälle zeigen eine Hypermethylierung der ICR1, die die Gene *H19* und *IGF2* reguliert, in ca. 50 % der Patienten wird eine Hypomethylierung der ICR2 gefunden, die die Gene *CDKN1C* und *KCNQ1* reguliert. Darüber hinaus können auch paternale UPDs [upd(11)pat] oder DNA Mutationen im *CDKN1C* Gen ursächlich sein [127, 150]. Allgemein zeigt sich in BWS-Betroffenen eine erhöhte Gen-Dosis des Wachstumsfaktors *IGF2* und/oder eine reduzierte Dosis des Suppressor-Proteins *CDKN1C*. Maternale Loss-of-function Mutationen des *CDKN1C* Gens sind mit BWS assoziiert [127].

Die Inzidenz für SRS liegt ungefähr bei 1:100.000 Neugeborenen. Es handelt sich um eine kongenitale Entwicklungsstörung mit heterogener klinischer Manifestierung und unterschiedlichen genetischen Hintergründen. Im Gegensatz zu BWS-Kindern, zeigen SRS-Kinder eine verminderte Geburtsgröße und ein reduziertes Geburtsgewicht, häufig verbunden mit Mikrozephalien und Klinodaktylien und Gliedmaßen-Asymmetrien [151]. Die ausgewachsene, durchschnittliche Körpergröße bei Männern beträgt 151,2 cm, bei Frauen 139,9 cm [152]. Beim SRS ist ebenfalls der *H19/IGF2*-Lokus betroffen, darüber hinaus aber auch noch weitere geprägte Gene wie *MEST (PEG1)*, *PEG3*, *PEG10* und *GRB10* auf Chromosom 7. Maternale UPDs [upd(7)mat] begründen 5-10 % der SRS-Fälle. Ca. 35 % - 50 % werden durch Hypomethylierungen der paternalen ICR1 auf Chromosom 11p15.5 [152] bedingt. Eine reduzierte *IGF2*-Expression ist die häufigste SRS-Anomalie [153] und begründet wahrscheinlich den Minderwuchs. *H19* Hypomethylierungen korrelieren mit dem Schweregrad der phänotypischen Krankheits-Ausprägung [154], sind aber noch weitgehend unverstanden.

1.2.3.3 Andere Imprinting-Krankheiten

TNDM1 ist eine Form des Diabetes Mellitus, der sich in den ersten sechs Lebenswochen manifestiert und bis zu 18 Monaten bestehen bleibt. Er äußert sich als intrauterine Wachstumsretardierung, neonatale Hyperglykämie und fehlende Ketoazidose. Im Kindesalter verwächst sich der TNDM1 wieder, wobei lebenslang eine erhöhte Diabetes

Mellitus Prädisposition bestehen bleibt und im Rahmen von Infektionen immer wieder Hyperglykämien auftreten können. Betroffene Frauen haben ein höheres Risiko Schwangerschaftsdiabetes zu entwickeln. Hervorgerufen wird TNDM1 durch genetische Aberrationen resultierend in einer Überexpression des geprägten Genlokus 6q24 [155, 156]. Normalerweise wird nur das paternale *PLAGL1* und *HYMAI* Allel exprimiert, durch eine paternale UDP wird die normale Gen-Dosis verdoppelt und TNDM1 hervorgerufen. Die [upd(6)pat] macht 41 % aller TNDM1 Fälle aus, 29 % werden von einer paternalen Duplikation hervorgerufen und weitere 30 % von einer Hypomethylierung der maternalen DMR durch die die maternalen Allele transkriptionell aktiviert werden. Die Hälfte dieser Patienten haben eine pathogenetische *ZFP57*-Mutation [155].

PHP-1b beschreibt eine heterogene Gruppe von Krankheiten, die alle eine Parathormon (PTH) Resistenz gemein haben [157]. Das bedeutet, es wird von der Nebenschilddrüse zwar genug Parathormon ausgeschüttet, aber die Wirkung bleibt aus, da Störungen der intrazellulären Signalkaskade vorliegen. In manchen Fällen ist die PTH Resistenz auch mit einer Thyreotropin (TSH) Resistenz gekoppelt [158]. PHP-1b äußert sich in einer Hypokalzämie und einer Hyperphosphatämie d.h. der Calciumspiegel im Blut ist reduziert, der Phosphatspiegel dagegen erhöht. Gründe für PHP-1b sind Methylierungs-Defekte verursacht durch paternale uniparentale Isodisomien auf Chromosom 20q13 [upd(20)pat] oder maternale Deletionen in den Genen *GNAS* oder *STX16* [127, 157], zumeist 3 kb Mikrodeletionen 220 kb upstream (zentromerisch) des *GNAS* Exons A/B [159].

Parentale UPD14-Syndrome betreffen das 14q32 Gen Cluster mit den paternal exprimierten Genen (PEGs) *DLK1* und *RTL1* und den maternal exprimierten Genen (MEGs) *MEG3*, *RTL1as* und *MEG8* sowie microRNAs und snoRNAs [160]. Die in dieser Arbeit untersuchte *MEG3* IG-DMR und *MEG3* Promotor DMR sind ebenfalls Teil dieses Clusters [161]. UPD14-Syndrome sind sehr selten, mit derzeit ungefähr 50 beschriebenen maternalen [upd(14)mat] bzw. 30 paternalen [upd(14)pat] Fällen [127, 161]. Das maternale UPD14-Syndrom ist auch unter dem Namen Temple Syndrom (TS14) bekannt, das paternale UPD14-Syndrom kennt man als Kagami-Otaga Syndrom (KOS14). Die phänotypischen Merkmale von TP14 sind variabel und wenig spezifisch. Kennzeichnend sind prä- und postnataler Kleinwuchs und eine vorzeitige Pubertät. Bei KOS14-Patienten tritt schon intrauterin eine Polyhydramnie auf. Rippen und Thorax des Kindes zeigen charakteristische Knochenanomalien, außerdem haben die Kinder typische faziale Merkmale und sind häufig mental retardiert. Die Gründe für die

veränderte Genexpression des 14q32 Locus sind unterschiedlich und reichen von Epimutationen, die zu Hyper- oder Hypomethylierung führen, bis hin zu submikroskopischen Deletionen [127, 161]. Eine [upd(14)mat] kann auch durch eine Robertson-Translokation hervorgerufen werden [127].

1.3 Barker Hypothese und Epigenetik (Exposition-Response-Beziehung)

Bei der Entstehung von Krankheiten, phänotypischen Merkmalen oder Eigenschaften einzelner Individuen ist häufig eine Vielzahl von Faktoren beteiligt. Neben genetischen Veranlagungen spielen auch exogene Umwelteinflüsse und das individuelle Verhalten eine wichtige Rolle [162, 163]. Der Epidemiologe David Barker (1938-2013) postulierte 1990 die nach ihm benannte Barker Hypothese, auch bekannt als „Developmental Origins of Health and Disease“ (DOHAD) Hypothese [164] oder als „Konzept der fetalen Reprogrammierung“. Diese besagt, dass chronische Krankheiten wie beispielsweise Diabetes, Adipositas, kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebs, Asthma und weitere metabolische Erkrankungen nicht nur durch einen ungesunden adulten Lebensstil erklärt werden, sondern auch durch eine ungünstige fetale Umgebung, sowie widrige Umstände in der frühen Kindheit. Nachteilige intrauterine Stimuli können z. B. fetomaternale Mangelernährung ebenso wie Überernährung sein [165, 166], aber auch Nikotin-Exposition, oxidativer Stress oder Drogenkonsum. Wird der Metabolismus von vorne herein falsch determiniert, kann das auch im Jugend-, Erwachsenen- oder hohen Alter pathologisch für die Krankheitsentstehung sein [167, 168]. Negative Umgebungsbedingungen vor, während oder auch nach der Empfängnis, bedingen eine lebenslang erhöhte Krankheitsprädisposition für die betroffenen Individuen [169], da sie die Regulation metabolischer Pathways nachhaltig verändern können. Die dieser Gen-Umwelt-Interaktion zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind immer noch weitgehend unverstanden. Aufgrund ihrer außergewöhnlichen Plastizität, ist es aber sehr wahrscheinlich, dass persistente epigenetische Veränderungen, wie u.a. DNA-Methylierungsmuster, dabei eine essentielle Rolle spielen [137, 165, 170]. Von Umweltfaktoren induzierte, epigenetische Markierungen werden überwiegend in der frühen fetalen Entwicklungsphase vorgenommen [171]. Sie können die beiden genomweiten Methylierungs-Reprogrammierungswellen in der Keimbahn und der Präimplantationsphase umgehen oder erst danach etabliert werden. Einmal etabliert, bleiben sie jedoch ein Leben

lang stabil, werden bei Zellteilungen auf die Tochterzellen übertragen (zelluläres Gedächtnis) und können sogar über eine transgenerationale Vererbung von einer Generation an die nächste weitergegeben werden [137, 172, 173]. Epigenetische Mutationen (stochastisch oder durch Umweltfaktoren bedingt) sind deutlich häufiger als klassische genetische Mutationen und tragen in bisher unterschätztem Ausmaß (über Veränderungen der Genexpression) zur Krankheitsentstehung aber auch zur phänotypischen Variation bei. Aus diesem Grund haben epigenetische Analysen eine besondere Bedeutung, was die Erforschung der Entstehung von Volkskrankheiten wie Diabetes anbelangt.

1.4 Gestationsdiabetes mellitus (GDM)

Gestationsdiabetes mellitus (GDM), ist definiert als Glukose-Toleranzstörung/Kohlenhydratstoffwechselstörung die sich erstmals während der Schwangerschaft manifestiert und typischerweise im zweiten Trimester diagnostiziert wird [174, 175]. Nach der Entbindung verschwindet der Diabetes in der Regel wieder, GDM-Müttern bleibt allerdings ein erhöhtes Risiko später einen Typ 2-Diabetes oder im Falle einer weiteren Schwangerschaft einen erneuten GDM auszubilden. Außergewöhnliche hormonelle Umstellungen während der Schwangerschaft (steigende Laktogen-, Prolaktin- und Östrogen-Level) begünstigen die GDM Entstehung, besonders wenn weitere Risikofaktoren und Prädispositionen dazu kommen, wie bei einer positiven Diabetes Familienanamnese [176]. Ein GDM entsteht dann, wenn die mütterliche Insulin-Produktion in den β -Zellen der Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse, dem gestiegenen Insulin-Bedarf (verdoppelt bis verdreifacht), nicht mehr standhalten kann. Dies ist meist erst in einem späten Schwangerschaftsstadium der Fall. Der Blutzuckerspiegel kann dann nicht mehr ausreichend kontrolliert werden, was sich in einer maternalen Hyperglykämie äußert, die wiederum die fetale Insulin-Produktion stimuliert (fetaler Hyperinsulinismus) [165]. Die Prävalenz von GDM liegt in verschiedenen Ländern zwischen 2 % und 17,8 %, abhängig von Diagnosekriterien und Ethnizität [174, 177-179]. In den letzten Jahrzehnten wurde jedoch weltweit eine allarmierende Zunahme der Prävalenz von Adipositas, Typ 2-Diabetes und GDM festgestellt [175, 178, 180]. Die epidemische Ausbreitung von GDM-Schwangerschaften ist multifaktoriell bedingt und kann nicht alleine durch genetische Risikofaktoren bzw. durch einen veränderten mütterlichen Lebensstil erklärt werden [181]. Körperliche Inaktivität in Verbindung mit starkem

Übergewicht (BMI > 25 kg/m²) leistet sicher einen Beitrag [182], fetale Faktoren und das intrauterine Milieu (als prägender Umwelteinfluss auf das sich entwickelnde Kind) werden dagegen weitgehend unterschätzt, sind aber auch von essentieller Bedeutung. Die Ätiologie von Typ 2-Diabetes und GDM sind sich sehr ähnlich. Das sich entwickelnde Kind ist *in utero* einer typischen diabetischen Situation ausgeliefert (unnatürlich hohen Konzentrationen an Glukose, Fett- und Aminosäuren). Die Plazenta stellt zwar eine Schranke für den fetomaternalen Insulinaustausch, nicht aber für den Glukoseaustausch dar. Aufgrund der Überzuckerung produziert die kindliche Bauchspeicheldrüse zusätzliches Insulin [183]. Als wachstumsstimulierendes Hormon steigert Insulin wiederum das fetale Wachstum (Größen- und Gewichtszunahme) und erhöht darüber die Makrosomie-, Viszeromegalie-, Früh- und Fehlgeburtenrate, sowie einige metabolische neonatale Störungen und Geburtskomplikationen wie Hypoxämien [184, 185]. GDM ist aber nicht nur mit ungünstigen Konsequenzen in der Fetalentwicklung, sondern auch mit einer erhöhten Morbidität im späteren Leben assoziiert. Nachkommen von GDM-Müttern entwickeln aufgrund der intrauterinen Exposition selbst zeitlebens eine erhöhte Suszeptibilität für Adipositas, Diabetes Typ 2 und eine beeinträchtigte Glukosetoleranz (engl. impaired glucose tolerance (IGT)) (siehe Abbildung 5). Darüber hinaus aber auch Beta-Zellhypertrophien, Herz-Kreislauf-Erkrankungen bis hin zu neuropsychiatrischen Krankheiten und sogar Krebs [183, 186-191].

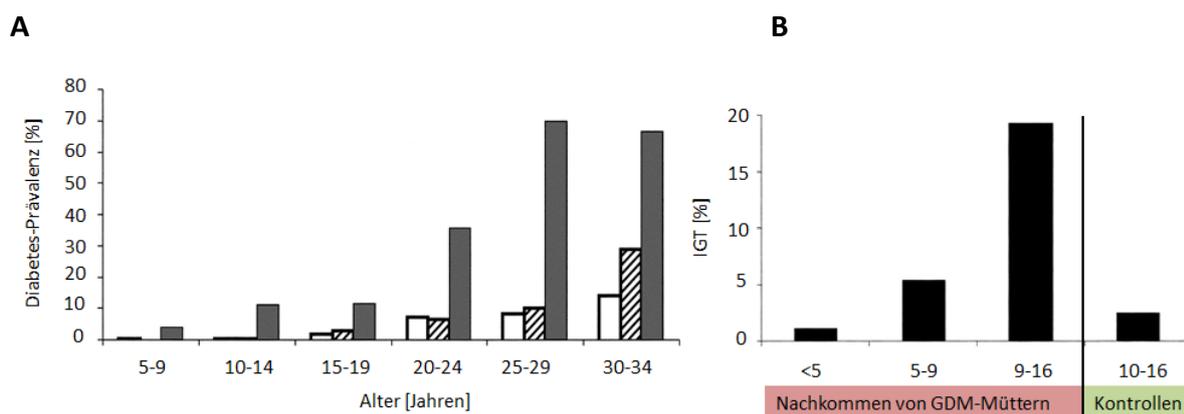


Abbildung 5: Anstieg der GDM-induzierten IGT und Diabetes-Prävalenz

A: Entwicklung der Langzeit-Prävalenz für Typ 2 Diabetes in 5 bis 34 jährigen Pima-Indios. Nachkommen von Nicht-GDM-Müttern sind weiß dargestellt, Nachkommen von prädiabetischen Müttern gestrichelt und Nachkommen von GDM-Müttern schwarz. GDM-Kinder haben eine deutlich erhöhte Prävalenz im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen.

B: Entwicklung der Langzeit-Prävalenz für IGT in drei Altersgruppen von GDM-Nachkommen im Vergleich zu Nicht-GDM-Kontrollen. Der Alters-Anstieg ist signifikant ($p \leq 0,001$), ebenso der GDM-/Nicht-GDM-Gruppenvergleich ($p = 0,005$).

Abbildung entnommen und verändert nach Dabelea et al., 2000 und Silverman et al., 1995 [183, 192].

Die der fetalen Programmierung zugrundeliegenden, molekularen Mechanismen und Funktionsnetzwerke sind immer noch weitgehend unverstanden. Man vermutet, dass die fetale Überernährungssituation zu persistierenden epigenetischen Veränderungen führt, die wiederum Appetitkontrolle, Energiemetabolismus und neuroendokrine Faktoren steuern [181]. Aus den negativen Effekten der *in utero* Überernährungssituation ergibt sich eine transgenerationale Rückkopplungsschleife [165, 181, 193]. Kinder, die mütterlichem Diabetes/Adipositas während der Schwangerschaft ausgesetzt waren, haben selbst ein erhöhtes Lebenszeit-Risiko adipös zu werden, Diabetes Typ 2 zu entwickeln und diese Veranlagung auch wieder an ihre Kinder weiterzuerben [165]. Es ist wahrscheinlich, dass sich Prävalenz und Ausprägung von Diabetes mellitus dadurch schleichend von einer Generation zur nächsten steigert [193, 194]. Während der frühen Entwicklung (Konzeptions- und intrauterine Phase) haben Umgebungsfaktoren einen größeren Einfluss auf das Epigenom als dies im Kindes- oder Erwachsenenalter der Fall ist. Eine erfolgreiche Schwangerschaft bemisst sich demnach nicht nur zum Geburtszeitpunkt selbst, sondern auch anhand der Gesundheit in der Adoleszenz und der Resilienz gegenüber Volkskrankheiten [181]. Für die langfristige Gesundheit von Mutter und Kind ist das Erkennen eines GDMs essentiell. Frühzeitige Tests zur GDM-Diagnose erlauben es den betreuenden Frauenärzten und Diabetologen die Störung des Zuckerhaushaltes und die Insulin-Resistenz zu behandeln und dem drohenden übermäßigen fetalen Wachstum entgegen zu steuern, bevor er begonnen hat [174]. Es ist anzunehmen, dass über eine erfolgreiche Diabetes-Behandlung eine nachteilige epigenetische Programmierungen des Kindes reduziert oder ganz unterbunden werden kann [181]. Dies erfordert neben der richtigen Diagnose eine intensive Überwachung der betroffenen werdenden Mütter. Das Behandlungsspektrum umfasst die Eigenüberwachung des Blutzuckerspiegels, Diäten, orale Medikation und Insulin-Injektionen [175]. Ein schwach ausgeprägter GDM wird normalerweise zuerst mit einer speziellen Diät behandelt (bestehend aus ca. 45 % Kohlenhydrate, 30 - 35 % Fett und bis zu 20 % Proteinen). Kann der Diabetes darüber nicht kontrolliert werden, geht man zu einer Insulin-Therapie über [179]. Zur Diagnose werden ein- oder zweizeitige orale Glukosetoleranztests (oGTT) durchgeführt, deren Kosten in

Deutschland von der gesetzlichen Krankenversicherung getragen werden. Solche Screenings können entweder selektiv, auf Risikofaktoren aufbauend oder universell durchgeführt werden [174]. In Deutschland macht man den oGTT routinemäßig zwischen der 24. und 28. Schwangerschaftswoche (SSW) bei jeder (auch beschwerdefreien) Schwangerschaft. Er sollte aber schon deutlich früher durchgeführt werden, wenn bereits eine vorangegangene Schwangerschaft von GDM betroffen war [194]. Untersuchungszeitpunkt, Diagnosekriterien, Behandlungsweisen und Schwellenwerte sind global sehr unterschiedlich festgelegt und werden hinsichtlich ihrer Kosten-Nutzen-Relation kontrovers diskutiert. Es bedarf dringend einer Vereinheitlichung sowie einiger Richtlinien professioneller Organisationen zur allgemeinen GDM-Definition [174, 175, 179]. Dieses Problem beschränkt sich nicht nur auf Entwicklungsländer, sondern gerade auch auf industrialisierte westliche Länder, in denen aktuell über 20 % der Mütter (Tendenz steigend) schon vor der Schwangerschaft übergewichtig sind und damit zur Risikogruppe zählen [181]. Damit langfristige negative Auswirkungen besser abgeschätzt und vorhergesagt werden können, bräuhete man gute Biomarker und einen besseren Einblick in die fetale Epigenom-Programmierung. Es muss noch viel in diesem Bereich geforscht werden, um eventuell irgendwann in der Lage zu sein, widrige pränatale Umstände postnatal korrigieren zu können [10].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung der im Rahmen dieser Doktorarbeit getätigten Untersuchungen war es epigenetische Effekte fetaler Überernährung (bei GDM) zu studieren und darüber einen Beitrag zur Aufklärung von Mechanismen der fetalen Programmierung zu liefern. Über die Identifikation neuer Gene sowie eines fundierten Verständnisses von Gen-Interaktionen im Kontext mütterlichen Diabetes/Adipositas, könnten in Zukunft neue Konzepte für Therapie und Prävention erstellt werden. Dazu standen (vor allem) Nabelschnurblutproben von Neugeborenen und klinische Daten von Kind und Mutter zur Verfügung, die in einer Kollaboration mit Dr. Lehnen (Chefarzt für Frauenheilkunde in den Städtischen Kliniken Mönchengladbach) gesammelt wurden. Typisch für viele Volkskrankheiten ist die Beteiligung einer großen Zahl an Loci im Epigenom. Deshalb war es auch für GDM wahrscheinlich, eine Assoziation multipler Gen-Regionen mit epigenetischen Modifikationen festzustellen, die die

Krankheitsrisiken im späteren Leben bedingen könnten. Über einen hypothesenfreien Ansatz mit hochauflösenden Methylierungsarrays sollten diese Zielregionen gefunden werden (Vergleich GDM-/Kontroll-Kohorte). Die zusätzliche Unterteilung der GDM-Proben in eine Insulin behandelte (I-GDM) und eine diätisch behandelte (D-GDM) Gruppe, sollte auch die Behandlungsweise berücksichtigen. Gene, für die signifikante Methylierungsunterschiede detektiert werden konnten, sollten mit einer zweiten unabhängigen Methode (quantitative Bisulfit-Pyrosequenzierung) in einer größeren Stichprobenzahl validiert werden. Wenn man die Auswirkungen von Umwelteinflüssen auf das Epigenom untersucht, vergleicht man gewöhnlich nur die Durchschnittsmethylierung einer Zielregion in einer Untersuchungsgruppe, die diesem besonderen Stimulus ausgesetzt war im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, die das nicht war. In GDM-Neugeborenen wurde in einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe so z.B. eine niedrigere *MEST*-Methylierung gefunden [195]. Für geprägte Gene kann man dabei allerdings nicht zwischen maternalem und paternalem Allel unterscheiden und auch nicht eruieren, ob Aberrationen auf verteilte Einzel-CpG-Fehler oder auf Allel-Fehler zurückgehen, bei denen die Mehrzahl der CpGs in einem DNA-Molekül (Allel) betroffen sind. Funktionelle Konsequenzen sind für Einzel-CpG-Fehler eher unwahrscheinlich, sind jedoch ganze Allele mehrheitlich falsch methyliert, so sind daraus resultierende transkriptionelle Auswirkungen plausibel (aberrante Aktivierung bzw. Stilllegung der betroffenen Allele) [49]. Aus diesem Grund sollten für *MEST* und zwei weitere ausgewählte, geprägte Gene der GDM-abhängigen metabolischen Programmierung (*MEG3* und *PEG3*) hochauflösende Methylierungsanalysen durchgeführt werden. Durch Deep Bisulfite Sequencing (DBS) können Methylierungsprofile einer großen Anzahl individueller (mütterlicher oder väterlicher) DNA-Moleküle visualisiert und allel-spezifische Epimutationsraten mit potenzieller funktioneller Relevanz kalkuliert werden. Die dabei detektierten Effekte sollten dazu ebenfalls auf dem Expressionsniveau untersucht werden. Da geprägte Gene vielseitige Funktionen in Wachstumsprozessen und im Metabolismus haben und sie (aufgrund ihrer funktionellen Haploidie) besonders suszeptibel für epigenetische Veränderungen sind, sind sie besonders interessant um die Entwicklungsprogrammierung adulter Krankheiten zu studieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Biologisches Material

In dieser Studie wurden fetale Nabelschnurblutproben (FCB) mittels Array, Pyrosequenzierung und Deep Bisulfite Sequencing (DBS) untersucht. Das Nabelschnurblut wurde von Geburtshelfern in den Städtischen Kliniken Mönchengladbach abgenommen und gesammelt. Es wurde zwischen Kontrollfällen und Gestational Diabetes Mellitus (GDM) Fällen unterschieden. Zweitere Gruppe wurde anhand der Behandlungsweise zusätzlich unterteilt in diätisch-behandelte (D-GDM) und Insulin-behandelte GDM (I-GDM) Proben. Eine Genehmigung des Ethikkomitees der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg für das Arbeiten mit selbiger Probensammlung, sowie eine Einverständniserklärung der Eltern liegt vor (Votum Nr. 11/13 und 212/15). Nach der Blutabnahme wurden die Proben unverzüglich in EDTA-gepufferten Röhrchen bei -80 °C eingefroren und bis auf Weiteres dort gelagert. Der GDM wurde zwischen der 24. und 27. Schwangerschaftswoche über einen oralen Glukosetoleranztest (oGTT) festgestellt. Die werdenden Mütter bekamen nach 8-12 h Fastenzeit 75 g Glukose in Wasser gelöst zu trinken. Der Blutzuckerspiegel wurde jeweils nach einer und nach zwei Stunden gemessen. Ein Schwangerschaftsdiabetes lag vor, wenn der Blutzucker nach einer Stunde noch >180 mg/dl (10.0 mmol/l) und nach zwei Stunden noch >155 mg/dl (8.6 mmol/l) betrug. Nach der Diagnose bekamen die Patientinnen eine Diabetologen-Beratung hinsichtlich einer geeigneten Behandlungsweise. Die Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) und die American Dietetic Association (ADA) empfehlen zuerst eine diätische Kost bestehend aus 45 % Kohlenhydraten, 30 – 35 % Fett und bis zu 20 % Proteinen. Pro Kilogramm Körpergewicht sollte nicht mehr als 0,8 g Protein verzehrt werden. Wenn der HbA1c-Wert („Langzeit-Blutzucker“; < 6 %) sowie die gemessenen Glukoselevel nicht deutlich verbessert werden konnten (< 92 mg/dl auf nüchternem Magen, < 140 mg/dl nach einer Stunde und < 120 mg/dl nach zwei Stunden), wurde auf eine insulinbasierte Behandlungsstrategie umgestellt (Basis-Bolus-Therapie oder Insulin-Pump-Therapie). In Tabelle 1 und Tabelle 2 sind die klinischen Parameter für die Array- und Pyrosequenzierungskohorten aufgelistet. Für die DBS Experimente wurde auf eine solche Auflistung verzichtet, da dort nach heterozygoten Proben präselektiert wurde

und sich die Untersuchungskohorte somit für jedes Gen etwas unterschied. Für alle Experimente wurde darauf geachtet, Zwillingsschwangerschaften auszuschließen und nur Lebendgeburten zu untersuchen. Andere klinische Parameter (wie z.B. Geschlecht des Kindes, Schwangerschaftswoche (SSW), BMI der Mutter, etc.) wurden für jedes Experiment so gut wie möglich gematcht um eventuell daraus resultierende Störfaktoren auszuschließen. In Tabelle 1 wird zwischen zwei Arraykohorten unterschieden, die im Abstand von 2 Jahren untersucht wurden. In Kohorte A wurden vier Einzelarrays mit insgesamt 38 Proben analysiert, Kohorte B umfasste 94 Proben und acht Einzelarrays. Erst in der zweiten Studie wurde zusätzlich zwischen I-GDM und D-GDM unterteilt, Kohorte A bestand ausschließlich aus I-GDM Fällen. Die p-Werte wurden mit SPSS Version 23 (IBM, Berlin, Deutschland) berechnet. Im Zweigruppenvergleich wurde zuerst auf Normalverteilung getestet (Shapiro-Wilk) und dann entweder ein t-Test oder ein Mann-Whitney-U-Test (MWU) durchgeführt. Für den Dreigruppenvergleich wurde eine parametrische einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA-Test) oder ein nicht parametrischer Kruskal-Wallis-Test herangezogen. Das Signifikanzlevel betrug 0,05. Signifikante Werte sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 entsprechend mit einem Stern (*) markiert.

Tabelle 1: Klinische Parameter der analysierten Arraykohorten

Array A	Kontrollen (n = 18)	I-GDM Proben (n = 20)	p-Wert
SSW	39,1 ± 0,9	39,2 ± 1,3	0,346
Mütterlicher BMI (kg/m ²)	25,2 ± 3,1	26,3 ± 3,5	0,303
Mütterliche Körpergröße (cm)	164,4 ± 6,7	167,9 ± 7,6	0,141
Gewicht vor der Schwangerschaft (kg)	69,8 ± 10,8	75,8 ± 12,9	0,133
Gewicht vor der Geburt (kg)	82,0 ± 11,3	88,6 ± 13,3	0,118
Mütterliches Alter (Jahre)	29,6 ± 2,8	31,0 ± 4,6	0,259
Geburtsmodus ²	6 CS, 12 VVB	3 CS, 15 UVB, 2 VVB	0,239
Geschlecht des Kindes ³	8 ♂, 10 ♀	11 ♂, 9 ♀	0,746
Geburtsgewicht (g)	3283,6 ± 420,7	3673,3 ± 515,9	0,016*
Nikotinkonsum ⁴	n.d.	17 NR, 3 R	n.d.
Blut pH	7,323 ± 0,050	7,279 ± 0,060	0,019*
BE	-0,6 ± 2,7	-1,1 ± 2,1	0,506
HbA1c (%)	n.d.	5,8 ± 0,6	n.d.
Plazentagewicht (g)	509,4 ± 105,8	566,2 ± 127,0	0,372
Frühgeburten (n) (<37 WoP)	0	1	n.d.

Diabetes vor der Schwangerschaft ⁵	0	1 TDM1, 1 TDM2	0,488	
Parität ⁶	7 PP, 6 BP, 5 MP	5 PP, 13 BP, 2 MP	0,965	
Fehlgeburtenrate	0,50 ± 0,71	0,15 ± 0,37	0,186	
Mütterliche Komorbiditäten ⁷	0	2 SF	n.d.	
Gewicht für das Gestationsalter ⁸	1 SGA, 17 AGA	15 AGA, 5 LGA	0,126	
Array B	Kontrollen (n = 46)	GDM Proben ¹ (n = 48)		p-Wert
		I-GDM (n = 24)	D-GDM (n = 24)	
SSW	39,5 ± 1,4	38,7 ± 1,5	39,1 ± 1,3	0,024*
Mütterlicher BMI (kg/m ²)	25,3 ± 6,4	29,9 ± 7,3	25,1 ± 4,1	0,018*
Mütterliche Körpergröße (cm)	166,3 ± 9,4	165,9 ± 5,9	165,3 ± 6,4	0,581
Gewicht vor der Schwangerschaft (kg)	71,7 ± 17,9	83,6 ± 20,6	69,0 ± 10,8	0,034*
Gewicht vor der Geburt (kg)	86,0 ± 17,7	96,7 ± 20,4	80,2 ± 10,6	0,009*
Mütterliches Alter (Jahre)	30,3 ± 5,8	31,3 ± 4,6	31,7 ± 6,1	0,526
Geburtsmodus ²	9 CS, 34 UVB, 3 VVB	5 CS, 18 UVB	9 CS, 14 UVB, 1 VVB	0,262
Geschlecht des Kindes ³	22 ♀, 24 ♂	12 ♂, 12 ♀	12 ♂, 12 ♀	0,978
Geburtsgewicht (g)	3391,2 ± 575,9	3465,4 ± 478,4	3396,9 ± 558,4	0,960
Nikotinkonsum ⁴	41 NR, 5 R	22 NR, 2 R	23 NR, 1 R	0,637
Blut pH	7,294 ± 0,089	7,263 ± 0,101	7,303 ± 0,055	0,368
BE	-3,6 ± 3,6	-3,2 ± 3,11	-1,5 ± 3,1	0,022*
HbA1c (%)	n.d.	5,9 ± 0,6	5,5 ± 0,4	0,020*
Plazentagewicht (g)	n.d.	552,1 ± 128,0	538,4 ± 111,0	0,900
Frühgeburten (n) (<37 WoP)	2	1	1	n.d.
Diabetes vor der Schwangerschaft ⁵	0	3 TDM1, 1 TDM2	0	0,007*
Parität ⁶	28 PP, 10 BP, 8 MP	13 PP, 9 BP, 2 MP	13 PP, 9 BP, 2 MP	0,491
Fehlgeburtenrate	0,46 ± 0,98	0,25 ± 0,61	0,29 ± 1,04	0,370
Mütterliche Komorbiditäten ⁷	1 BHD, 1 SF	1 BHD	1 PK	n.d.
Gewicht für das Gestationsalter ⁸	3 SGA, 40 AGA, 3 LGA	3 SGA, 19 AGA, 2 LGA	1 SGA, 18 AGA, 5 LGA	0,183

BE: base excess; BMI: body mass index; n: Probenzahl; n.d.: not determined; pH: potentia hydrogeneii; SSW: Schwangerschaftswoche; WoP = week of pregnancy; *p < 0,05; **p < 0,01.

¹GDM: gestational diabetes mellitus; D-GDM: diätisch behandelter GDM; I-GDM: Insulin behandelter GDM

²CS: cesarean section; UVB = unassisted vaginal birth; VVB = ventouse-assisted vaginal birth

³♂: männlich; ♀: weiblich

⁴R: Raucher; NR: Nichtraucher

⁵TDM1 = Typ 1 Diabetes mellitus, TDM2 = Typ 2 Diabetes mellitus

⁶PP = primipara, BP = bipara, MP = multipara (≥3 Geburten)

⁷BHD = Bluthochdruck, PK = Präeklampsie, SF = Schilddrüsenfehlfunktion

⁸SGA = small for gestational age (< 10 % Perzentile), AGA = appropriate for gestational age (10 %-90 % Perzentile), LGA = large for gestational age (> 90 % Perzentile)

Tabelle 2: Klinische Parameter der analysierten Pyrosequenzierungskohorte

Pyrosequenzierung	Kontrollen (n = 56)	GDM Proben ¹ (n = 129)		p-Wert
		I-GDM (n = 61)	D-GDM (n = 64)	
SSW	39,5 ± 1,4	38,8 ± 1,5	39,0 ± 1,4	0,007*
Mütterlicher BMI (kg/m ²)	25,2 ± 5,9	31,5 ± 8,1	25,7 ± 5,0	<0,001*
Mütterliche Körpergröße (cm)	166,6 ± 9,1	166,6 ± 6,5	165,4 ± 6,2	0,294
Gewicht vor der Schwangerschaft (kg)	71,8 ± 16,4	89,3 ± 23,4	71,1 ± 14,6	<0,001*
Gewicht vor der Geburt (kg)	85,8 ± 16,5	101,2 ± 24,0	84,2 ± 15,2	<0,001*
Mütterliches Alter (Jahre)	30,4 ± 5,8	32,2 ± 5,3	31,3 ± 6,1	0,243
Geburtsmodus ²	11 CS, 42 UVB, 3 VVB	17 CS, 43 UVB, 4 VVB	23 CS, 35 UVB, 1 VVB	0,041*
Geschlecht des Kindes ³	29 ♂, 27 ♀	34 ♂, 26 ♀	25 ♂, 38 ♀	0,152
Geburtsgewicht (g)	3332,2 ± 550,9	3540,0 ± 473,3	3311,6 ± 504,1	0,051
Nikotinkonsum ⁴	47 NR, 9 R	55 NR, 6 R	57 NR, 7 R	0,549
Blut pH	7,294 ± 0,089	7,278 ± 0,082	7,295 ± 0,061	0,593
BE	-3,6 ± 3,4	-2,2 ± 2,8	-2,0 ± 2,5	0,009*
HbA1c (%)	n.d.	5,8 ± 0,4	5,5 ± 0,3	<0,001*
Plazentagewicht (g)	n.d.	556,3 ± 127,1	517,8 ± 99,3	0,155
Frühgeburten (n) (<37 WoP)	3	3	3	n.d.
Diabetes vor der Schwangerschaft ⁵	0	5 TDM1, 3 TDM2	0	<0,001*
Parität ⁶	33 PP, 13 BP, 10 MP	25 PP, 23 BP, 12 MP	35 PP, 22 BP, 7 MP	0,203
Fehlgeburtenrate	0,52 ± 1,13	0,27 ± 0,55	0,31 ± 0,77	0,846
Mütterliche Komorbiditäten ⁷	1 BHD, 2 SF	3 BHD, 1 SF	1 BHD, 2 PK, 1 SF	n.d.
Gewicht für das Gestationsalter ⁸	4 SGA, 49 AGA, 3 LGA	6 SGA, 54 AGA, 4 LGA	1 SGA, 44 AGA, 13 LGA	0,006*

BE: base excess; BMI: body mass index; n: Probenzahl; n.d.: not determined; pH: potentia hydrogenii; SSW: Schwangerschaftswoche; WoP = week of pregnancy; *p < 0,05; **p < 0,01.

¹GDM: gestational diabetes mellitus; D-GDM: diätisch behandelter GDM; I-GDM: Insulin behandelter GDM

²CS: cesarean section; UVB = unassisted vaginal birth; VVB = ventouse-assisted vaginal birth

³♂: männlich; ♀: weiblich

⁴R: Raucher; NR: Nichtraucher

⁵TDM1 = Typ 1 Diabetes mellitus, TDM2 = Typ 2 Diabetes mellitus

⁶PP = primipara, BP = bipara, MP = multipara (≥ 3 Geburten)

⁷BHD = Bluthochdruck, PK = Präeklampsie, SF = Schilddrüsenfehlfunktion

⁸SGA = small for gestational age (< 10 % Perzentile), AGA = appropriate for gestational age (10 % - 90 % Perzentile), LGA = large for gestational age (> 90 % Perzentile)

Für die DBS Studien mit dem GS Junior wurden zusätzlich zu den Nabelschnurblutproben auch adulte Blutproben untersucht. Diese stammen von Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik. Leider war es nicht möglich, umfassende klinische Parameter für diese

Proben zu erheben, lediglich die Altersgruppe, das Geschlecht und die Ethnie sind bekannt (siehe Tabelle 3). Des Weiteren wurde Viszeralfett (VAT) sowie Spermienproben untersucht. Die zugehörigen Daten wurden von Anna Maierhofer und Ramya Potabatulla erhoben und von mir statistisch ausgewertet.

Tabelle 3: Adulte Blutkohorte

ID (n = 30)	Altersgruppe	Geschlecht	Ethnie	ID (n = 30)	Altersgruppe	Geschlecht	Ethnie
K1	20-30	weiblich	deutsch	K16	31-40	weiblich	deutsch
K2	20-30	weiblich	deutsch	K17	31-40	weiblich	deutsch
K3	20-30	weiblich	deutsch	K18	41-50	weiblich	deutsch
K4	20-30	weiblich	deutsch	K19	41-50	weiblich	deutsch
K5	20-30	weiblich	deutsch	K20	41-50	weiblich	deutsch
K6	20-30	weiblich	deutsch	K21	41-50	weiblich	deutsch
K7	20-30	weiblich	deutsch	K22	51-60	weiblich	deutsch
K8	20-30	weiblich	deutsch	K23	20-30	männlich	deutsch
K9	20-30	weiblich	deutsch	K24	20-30	männlich	deutsch
K10	31-40	weiblich	deutsch	K25	31-40	männlich	deutsch
K11	31-40	weiblich	deutsch	K26	31-40	männlich	deutsch
K12	31-40	weiblich	deutsch	K27	31-40	männlich	deutsch
K13	31-40	weiblich	deutsch	K28	31-40	männlich	deutsch
K14	31-40	weiblich	deutsch	K29	41-50	männlich	deutsch
K15	31-40	weiblich	deutsch	K30	51-60	männlich	deutsch

ID: identification; K: Kontrolle; n: Probenzahl;

2.1.2 Materialien für Aufbau, Durchführung und Auswertung der Versuche

Im Folgenden sind alle verwendeten kommerziellen Kits, Reagenzien und Chemikalien, Apparaturen und Programme alphabetisch mit der Bezugsquelle und dem Firmensitz aufgelistet. Die verwendeten, handgemachten Puffer sind mit der genauen Zusammensetzung aufgeführt. Verbrauchsmaterialien und Einwegartikel, die zur allgemeinen Laborausstattung zählen, wurden von verschiedenen Herstellern bezogen und sind hier nicht explizit erwähnt.

2.1.2.1 Kommerzielle Kits und Reagenzien

Tabelle 4: Kommerzielle Kits und Reagenzien mit Herstellerinformationen

Bezeichnung	Hersteller und Firmensitz
AMPure XP Beads	Beckmann Coulter, Krefeld (GER)
Agilent DNA 7500 Kit	Agilent Technologies, Waldbronn (GER)
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies, Waldbronn (GER)
dATPs Solution	New England Biolabs, Ipswich (USA)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich (USA)
6x DNA Loading Dye	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden (GER)
EpiTect Fast 96 Bisulfite Conversion Kit	Qiagen, Hilden (GER)
EpiTect PCR Control DNA Set	Qiagen, Hilden (GER)
EZ 96 DNA Methylation Kit	Zymo Research, CA (USA)
FastStart Taq DNA Polymerase System	Roche Diagnostics, Mannheim (GER)
FlexiGene DNA Kit	Qiagen, Hilden (GER)
GeneRuler DNA Ladder Mix	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
GS Junior Titanium emPCR Kit (Lib-A)	Roche Diagnostics, Mannheim (GER)
GS Junior Titanium PicoTiterPlate (PTP) Kit	Roche Diagnostics, Mannheim (GER)
GS Junior Titanium Sequencing Kit	Roche Diagnostics, Mannheim (GER)
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus	Solis BioDyne, Tartu (EE)
HotStarTaq Mastermix Kit	Qiagen, Hilden (GER)
Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit	Illumina, San Diego (USA)
Klenow Fragment (3' → 5' Exo)	New England Biolabs, Ipswich (USA)
MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles)	Illumina, San Diego (USA)
NEBBuffer 2 (im Protokoll NEB2 Puffer)	New England Biolabs, Ipswich (USA)
NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Dual Index Primers Set 1)	New England Biolabs, Ipswich (USA)
10x PCR Rxn Buffer	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
PfuTurbo C _x Hotstart DNA Polymerase	Agilent Technologies, Waldbronn (GER)
PhiX Control v3	Illumina, San Diego (USA)
PyroMark Annealing Buffer	Qiagen, Hilden (GER)
PyroMark Binding Buffer	Qiagen, Hilden (GER)
PyroMark Gold Q96 CDT Reagents	Qiagen, Hilden (GER)
QIAGEN Multiplex PCR Kit	Qiagen, Hilden (GER)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden (GER)
Qubit dsDNA BR Assay Kit	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Qubit dsDNA HS Assay Kit	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit	Qiagen, Hilden (GER)
Streptavidin Sepharose High Performance	GE Healthcare BioSciences, Uppsala (SWE)
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
USER Enzyme	New England Biolabs, Ipswich (USA)

2.1.2.2 Chemikalien

Tabelle 5: Chemikalien mit Herstellerinformationen

Bezeichnung	Hersteller und Firmensitz
Alconox Detergent	Sigma-Aldrich, München (GER)
Essigsäure ROTIPURAN 100 % p.a. (C ₂ H ₄ O ₂), M = 60,05 g/mol	Roth, Karlsruhe (GER)
Ethanol ROTIPURAN ≥ 99,8% p.a. (EtOH; C ₂ H ₆ O) M = 46,07 g/mol	Roth, Karlsruhe (GER)

Ethidiumbromidlösung (EtBr) 10 mg/ml	Roth, Karlsruhe (GER)
Ethylendiaminetetraessigsäure (EDTA; C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ *2H ₂ O), M = 372,24 g/mol	AppliChem, Darmstadt (GER)
HDGreen Plus DNA stain	INTAS Science Imaging, Göttingen (GER)
Natriumchlorid (NaCl), M = 58,44 g/mol	AppliChem, Darmstadt (GER)
Natriumhydroxid (NaOH) ≥ 99 % p.a., M = 40,00 g/mol	Roth, Karlsruhe (GER)
PegGold Universal Agarose	VWR, Darmstadt (GER)
Tris Puffer pH 8.0 (C ₄ H ₁₁ NO ₃), M = 121,14 g/L	AppliChem, Darmstadt (GER)

2.1.2.3 Apparaturen

Tabelle 6: Apparaturen mit Herstellerinformationen

Bezeichnung	Hersteller und Firmensitz
ABI Vii TM 7 System	Applied Biosystems TM , Foster City (USA)
AirClean 600 PCR Workstation UV-Bench	AirClean Systems, Raleigh (USA)
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn (GER)
ALPS 25 Manual Heat Sealer	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Bandelin Sonorex RK 52 Ultraschallbad	Bandelin electronics, Berlin (GER)
Delta Range PM 460	Mettler Toledo, Giessen (GER)
DNA Engine Tetrad 2 Thermal Cycler	Bio-Rad, München (GER)
EG4200-2NM Präzisionswaage	Kern&Sohn, Balingen (GER)
Elektrophoresis Power Supply	Bio-Rad, München (GER)
Exsikkator	Roth, Karlsruhe (GER)
Gel iX Imager	Intas Science Imager Instruments, Göttingen (GER)
GENE Mate Gelelektrophoresekammern	Starlab, Hamburg (GER)
GS Junior 454	Roche Diagnostics, Mannheim (GER)
High-Speed Microplate Shaker	Illumina, San Diego (USA)
Hybex Microsample Incubator	SciGene, Sunnyvale (USA)
Hybridization Oven	Illumina, San Diego (USA)
iScan System	Illumina, San Diego (USA)
Magnetic Particle Concentrator (MPC)	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
MiSeq	Illumina, San Diego (USA)
NanoDrop 2000c Spectrophotometer	VWR, Darmstadt (GER)
pH-Meter inoLab	WTW, Weilheim (GER)
Pipetten Eppendorf Multichannel Plus	Eppendorf, Hamburg (GER)
Pipetten Eppendorf Research Plus (0,1 µl-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg (GER)
POWER PAC 1000	Bio-Rad, München (GER)
Programmable Temperature Controller	VWR, Darmstadt (GER)
PyroMark Q96 Capillary/Reagent Tips/Capillary Tip Holder	Qiagen, Hilden (GER)
PyroMark Q96 MD Pyrosequencer	Qiagen, Hilden (GER)
PyroMark Q96 MD Vacuum Workstation System	Qiagen, Hilden (GER)
Qubit Fluorometer	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Rack Chamber 48 Pos. Te-Flow with consumables	Tecan Group Ltd., Männedorf (CHE)
SpeedVac Concentrator Plus	Eppendorf, Hamburg (GER)
TB2 Thermoblock	Analytik Jena, Jena (GER)
TruSeq Index Plate Fixture	Illumina, San Diego (USA)
TS-100 Thermoblock	VWR, Darmstadt (GER)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
<u>Zentrifugen:</u>	
Heraeus Multifuge 3SR+	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Heraeus Multifuge X1R	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)

Heraeus Multifuge X3	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Hettich Zentrifugen Mikro 20	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen (GER)
PCR-Plattenzentrifuge Perfect Spin	VWR, Darmstadt (GER)
Tischzentrifuge Eppendorf Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg (GER)
Tischzentrifuge Galaxy 16 DH	VWR, Darmstadt (GER)

2.1.2.4 Programme

Tabelle 7: Verwendete Programme und Online-Tools

Bezeichnung	Verwendung	Link oder Hersteller mit Firmensitz
Amplifyer	Analyse von Roche GS Junior Daten	Prof. Dr. Sven Rahmann, Universität Duisburg-Essen (GER)
BiSearch	Generierung und Größenbestimmung von Amplikons anhand der Primersequenzen	http://bisearch.enzim.hu/?m=genompsearch
Bismark v0.14.3	Alignment von Reads gegen eine Referenz	http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/bismark/
Bowtie2 v2.2.6	Readalignment	http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml
Clustal Omega v1.2.2	Multiple sequence alignment	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
Cutadapt v1.6	Adapter Trimming und Primereliminierung von FastQC Files	https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/
ENSEMBL-Datenbank	Lokalisierung von Amplikons	http://www.ensembl.org/index.html
FastQC v0.11.2	Tool zur Qualitätskontrolle von High-Throughput Sequenzierungsdaten	http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/
fastq-join ea-utils v1.1.2-537	Joining getrimmter Reads	https://expressionanalysis.github.io/ea-utils/
GenSearchNGS v4.4	Visualisierung-Tool für NGS Datensätze	http://www.phenosystems.com/www/index.php/products/gensearchngs
GenomeStudio	Analyse und Visualisierung der Array-Daten	Illumina, San Diego (USA)
GORILLA	Pathway Analyse der Array-Daten	http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/
Horvath clock	Bestimmung des Methylierungsalters von Array-Proben	https://labs.genetics.ucla.edu/horvath/dnamage/
Illumina Experiment Manager	Generierung des Sample Sheets	Illumina, San Diego (USA)
Intas GDS	Visualisieren von Gelbildern	Intas, Göttingen (GER)
Integrative Genomics Viewer (IGV)	Visualisierung von großen genomischen Datensätzen	http://software.broadinstitute.org/software/igv/
iScabSystem	Array	Illumina, San Diego (USA)
LASAGNA	TFBS Search tool	http://biogrid-lasagna.engr.uconn.edu/lasagna_search/
MethPrimer	Primerdesign für nicht bisulfitkonvertierte DNA	University of California San Francisco (UCSF) (USA) http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi
Microsoft-Office 2010	Datenauswertung, Textverarbeitung und Erstellen von Abbildungen	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
NCBI	Primerdesign und Datenauswertung	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/NationalCenterforBiotechnologyInformation , Rockville Pike (USA)
Primer3web v4.0.0	Primerdesign für nicht bisulfitkonvertierte DNA	http://primer3.ut.ee/
PyroMark MD	Genotypisierung	Qiagen, Hilden (GER)

PyroMark Q-CpG v1.0.9	Pyrosequenzierung	Qiagen, Hilden (GER)
PyroMark Assay Design v2.0	Primerdesign für bisulfitkonvertierte DNA	Qiagen, Hilden (GER)
QuantStudio™ Real-Time PCR Software (ViiA™ 7 Software v1.2.4)	Relative Quantifizierung der RT-qPCR-Ergebnisse mit der $\Delta\Delta C_t$ Methode	Applied Biosystems™ (USA) http://www.thermofisher.com/de/en/home/technical-resources/software-downloads/applied-biosystems-via-7-real-time-pcr-system.html
Reverse Complement		http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
RnBeads	Analyse und Visualisierung der Array-Daten	http://rnbeads.mpi-inf.mpg.de/
SPSS Version v23	Statistische und grafische Auswertung von DBS- und Pyrosequenzierungsdaten	IBM, Berlin (GER)
TrimGalore, v0.4.0	Adapter Trimming von FastQC Files	http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/

2.1.2.5 Pufferlösungen

Tabelle 8: Von Hand gemachte Puffer

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Zubereitungshinweise
Denaturierungspuffer (1 l)	- 8 g NaOH-Plätzchen	- Aqua dest. ad 1 l - Aufbewahrung bei RT
Elutionspuffer für DBS Library Aufreinigung (1 ml)	- 100 µl 10x PCR Rxn buffer - 400 µl Ampuwa-Wasser - 500 µl 1x TE-Puffer	- Aufbewahrung bei -20 °C
MELT-Puffer für DBS	- 85 µl 10 M NaOH - 5 ml ddH ₂ O	- Aufbewahrung bei RT
50x TAE-Puffer (1 l)	- 242 g Tris - 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8) oder 18,6 g EDTA - 57,1 ml 100% Essigsäure	- Aqua dest. ad 1 l - Autoklavieren - Verwendung als 1 x TAE Puffer - Aufbewahrung bei RT
1x TE-Puffer (1 l)	- 10 ml 1 M Tris (pH 8) - 2 ml 0,5 M EDTA	- Aqua dest. ad 1 l - pH auf 7,6 einstellen - autoklavieren - Aufbewahrung bei RT
Waschpuffer (1 l)	- 1,21 g Tris	- Aqua dest. ad 1 l - pH mit 4 M Essigsäure auf 7,6 einstellen - Aufbewahrung bei RT

2.1.3 Primer Sequenzen

Die für NGS und Pyrosequenzierung verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) hergestellt. Sämtliche Deep Bisulfite Sequencing (DBS) Primer, sowie die biotinylierten Pyrosequenzierungsprimer wurden HPLC aufgereinigt bestellt. Die Genotypisierungsprimer und die regulären PCR-Primer waren lediglich entsalzt. Die

Primerstocks wurden bei Raumtemperatur (RT) versandt und nach Erhalt mit entsalztem Wasser auf eine Stocklösungskonzentration von 100 µM verdünnt. Für die PCRs wurden 1:10 Primerverdünnungen mit einer finalen Konzentration von 10 µM eingesetzt. In Tabelle 9 bis Tabelle 14 sind die verwendeten Primersequenzen mit der Produktlänge, der Anzahl der untersuchten CpGs, der genauen chromosomalen Lokalisation des Amplikons und der Genstruktur angegeben (ENSEMBL Release 85, <http://www.ensembl.org/index.html>). Biotinylierte Primer wurden mit einem Stern gekennzeichnet (*). Alle NGS- und Pyrosequenzierungsprimer wurden mit dem PyroMark Assay Design (Qiagen, Hilden, Deutschland) designt und sind für bisulfitkonvertierte Template-DNA konzipiert. In Abbildung 6 wurden die Pyrosequenzierungsprimer mit dem Clustal Omega multiple sequence alignment Version 1.2.2. (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) gegen die sechs untersuchten Amplikons geblastet. Der Übersicht sind die genauen Bindungsstellen der Pyrosequenzierungsprimer, sowie die Länge der untersuchten Assays und die Lokalisierung der CpGs zu entnehmen. CpG-Stellen, die in zuvor durchgeführten Illumina Infinium HumanMethylation450 Array-Experimenten auffällig waren (z.B. einen signifikanten Gruppenunterschied zwischen I-GDM und Kontrollen aufwiesen) und deshalb mittels Pyrosequenzierung validiert werden sollten, sind in der Abbildung grau markiert. Die Genotypisierungsprimer wurden mit dem Online-Tool Primer3web (<http://primer3.ut.ee/>) für genomische, nicht konvertierte DNA erstellt. Sowohl für die Pyrosequenzierung als auch für die Genotypisierung wurde der PyroMark Q96 MD Pyrosequencer (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet, allerdings wurde bei Ersterer die Methylierung mit der PyroMark Q-CpG Software (Qiagen, Hilden, Deutschland) und bei Zweiterer die Software PyroMark MD (Qiagen, Hilden, Deutschland) genutzt. Der analysierte Single Nucleotide Polymorphismus (SNP) ist mit der rs-Nummer, dem IUPAC Code und der Minor Allele Frequency (MAF) aufgeführt (siehe Tabelle 10). Die beiden Universal-Adapter 1^(a) und 2^(b) für DBS mit dem Roche GS Junior sind direkt upstream an die amplikonspezifische Primersequenz gebunden und entsprechend markiert (siehe Tabelle 11). In Tabelle 12 sind die MID-Primersequenzen (multiplex identifiers) aufgelistet, mit der die Proben innerhalb des zweiten Amplifikationsschrittes und vor dem Poolen mit einem spezifischen Barcode versehen wurden. Die AUT-Primer (Primer A Universal Tag und 454 Titanium) entsprechen dem forward, die BUT-Primer (Primer B Universal Tag und 454 Titanium) dem reverse Primer des jeweiligen MIDs. Die Sequenzen sind in 5' → 3' Reihenfolge angegeben und umfassen je eine

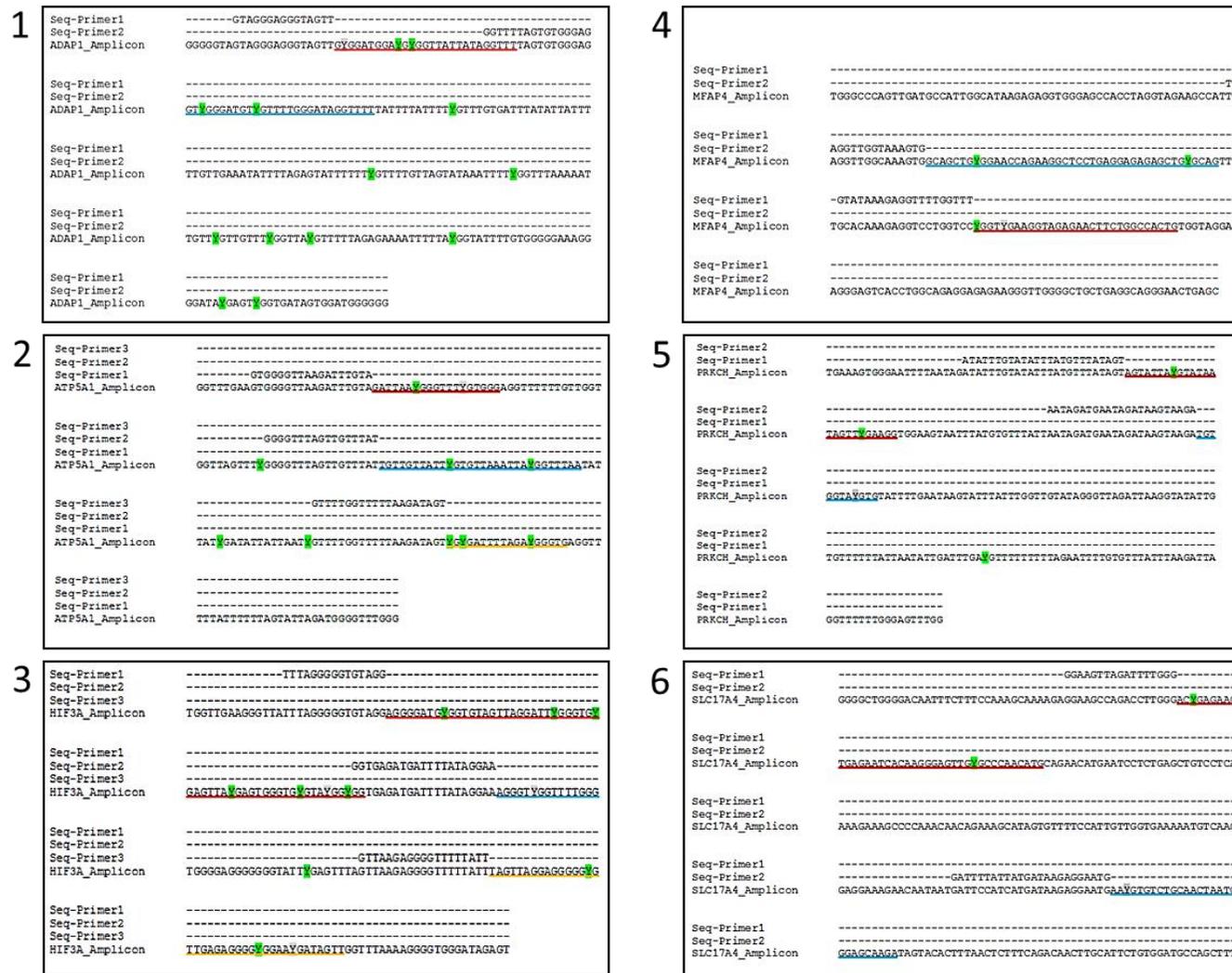
454 Titanium-Sequenz (A oder B), gefolgt von einer key-Sequenz, einer individuellen MID-Sequenz und einem Universal-Adapter (1 oder 2). Die key-Sequenz wird benötigt für die Kalibrierung der Lichtemission während des Sequenzierungsvorgangs. Da MID 23 im Experiment nicht so gut funktionierte und nur wenige Reads damit generiert werden konnten, wurde dieser MID für die Versuche ausgeschlossen, sodass bei einem Durchlauf gleichzeitig 29 Proben für ein Gen und maximal 2 Gene parallel untersucht werden konnten. Tabelle 14 führt die NEBNext (New England Biolabs, Ipswich, USA) Index Primers zum Barcoden der 24 Libraries für das Sequenzieren mit dem Illumina MiSeq auf. Die Primer i501-i508 entsprechen den forward Primern, i701-i712 den reverse Primern. Zum Barcoden der 24 Pools wurden Kombinationen aus 24 unterschiedlichen forward und reverse Primer-Kombinationen verwendet.

Für die *MEG3* IG-DMR wurde sowohl der Roche GS Junior Assay als auch der Illumina MiSeq Assay ursprünglich für acht CpGs designend. Letztendlich analysiert wurden jedoch nur die fünf überlappenden CpGs, da die benachbarten CpGs (vor als auch nach dem Überlappungsbereich) kein eindeutig geprägtes Muster mehr aufwiesen und der Verdacht somit nahe liegt, dass die DMR insgesamt nicht mehr als die fünf überlappenden CpGs umfasst. In der Literatur sind keine definierten Imprinting-Grenzen für diesen Locus bekannt, allerdings wurden in anderen Studien kommentarlos ebenfalls nur die fünf CpGs untersucht [196].

Tabelle 9: Primer für Pyrosequenzierungen (Template: bisulfitkonvertierte DNA)

Gen	Primer	Sequenz (5'-3')	Amplikonlänge	Chromosomale Lokalisierung (ENSEMBL release 85) Genstruktur	Anzahl der CpGs
<i>ADAP1</i>	Forward	GGGGGTAGTAGGGAGGGTA	272 bp	Chr. 7: 904.946-905.218	
	Reverse*	TCCCCCATCCACTATC		Promotor Flanking Region	
	Sequencing 1	GTAGGGAGGGTAGTT		<u>ENSR00001556791</u>	3+
	Sequencing 2	GGTTTTAGTGTGGGAG			2
<i>ATP5A1</i>	Forward	GGTTTGAAGTGGGGTTAAGATT	210 bp	Chr. 18: 46.098.577-46.098.787	
	Reverse*	CCCAAACCCCATCTAATACTA		Promotor <u>ENSR00000525323</u>	
	Sequencing 1	GTGGGGTTAAGATTTGTA			2+
	Sequencing 2	GGGGTTTAGTTGTTTAT			2+
<i>HIF3A</i>	Sequencing 3	GTTTTGGTTTTAAGATAGT			3
	Forward	TGGTTGAAGGGTTATTTAGGG	227 bp	Chr. 19: 46.298.269-46.298.496	
	Reverse*	ACTCTATCCCACCCCTTTT		Promotor <u>ENSR00001818095</u>	
Sequencing 1	TTTAGGGGGTGTAGG			7+	
<i>MFAP4</i>	Sequencing 2	GGTGAGATGATTTTATAGGAA			1+
	Sequencing 3	GTTAAGAGGGGTTTTTATT			3
	Forward	GGGTTTAGTTGATGTTATTGGTATAAGA	236 bp	Chr. 17: 19.384.520-19.384.756	
Reverse*	ACTCAATCCCTACCTCAACAA	Promotor Flanking Region			
<i>PRKCH</i>	Sequencing 1	GTATAAAGAGGTTTTGGTTT		<u>ENSR00001805753</u>	2+
	Sequencing 2	TGAGGTTGGTAAAGTG			2
<i>SLC17A4</i>	Forward	TGAAAGTGGGAATTTTAATAGATATTTGTA	258 bp	Chr. 14: 61.534.229-61.534.487	
	Reverse*	CCAAACTCCAAAAACCTAATCTT		Enhancer <u>ENSR00001789871</u>	
	Sequencing 1	ATATTTGTATATTTATGTTTATAGT			2+
<i>SLC17A4</i>	Sequencing 2	AATAGATGAATAGATAAGTAAGA			1
	Forward	GGGTTGGGGATAATTTTTTTTAAAG	301 bp	Chr. 6: 25.779.446-25.779.747	
	Reverse*	CCAAAATAACATCCACAAAATACA		UTR <u>ENSE00001475459</u>	
	Sequencing 1	GGAAGTTAGATTTTGGG			2+
Sequencing 2	GATTTTATTATGATAAGAGGAATG			1	

* 5'-biotinyliert; bp: Basenpaare; Chr.: Chromosom; CpG: Cytosin-phosphatidyl-Guanin Dinukleotid.



Pvro 1
Pvro 2
Pvro 3
Y: CpGs
Y: Array CpG

Abbildung 6: Clustal Omega Alignment der Pyrosequenzierungsprimer

1: ADAP1, 2: ATP5A1, 3: HIF3A, 4: MFAP4, 5: PRKCH, 6: SLC17A4; erstellt mit Clustal Omega multiple sequence alignment (Version 1.2.2.).

Tabelle 10: Primer für Genotypisierungen (Template: nicht bisulfitekonvertierte DNA)

Gen	Primer	Sequenz (5'-3')	Amplikonlänge	Chromosomale Lokalisierung (ENSEMBL release 85) Genstruktur	SNP IUPAC Ambiguity code Globale MAF
MEG3 IG-DMR	Forward*	CCTTGGACAAGAGACACATAGT	174 bp	Chr. 14:100.809.314-100.809.488 <i>DLK1-GTL2</i> intergenic (primary) DMR	rs7159412
	Reverse	GGTGAATCACAGGGAATGATG			Y (C/T)
	Sequencing	CTGGCAAACCCAGTT			0,13 (C)
MEG3 Promotor	Forward	TGGTGGTCGCTCGAAAATC	164 bp	Chr. 14:100.827.114-100.827.278 Promotor ENSR00000099925	rs10134980
	Reverse*	AGAAACCTGCCACGTAGCC			M (A/C)
	Sequencing	TTGCCATTTCTTTGT			0,17 (A)
MEST	Forward*	CTCTGGTGC GACTTAAAGGATAG	120 bp	Chr. 7:130.492.915-130.493.035 Promotor ENSR00000069136	rs2301335
	Reverse	TCGGCACTGCGATTATCC			R (G/A)
	Sequencing	AGGTGCGCCACGGAG			0,46 (A)
PEG3	Forward	CTAGCGCACCTCATGGC	90 bp	Chr. 19:56.840.621-56.840.711 Promotor ENSR00000349150	rs2302376
	Reverse*	GCTGCGGGAGGAGAGTTT			Y (C/T)
	Sequencing	CCCAGGGTGGACATC			0,20 (T)

* 5'-biotinyliert; bp: Basenpaare; Chr.: Chromosom; CpG: Cytosin-phosphatidyl-Guanin Dinukleotid; IG-DMR: intergenic differentially methylated region; IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry; MAF: minor allele frequency; SNP: single nucleotide polymorphism.

Tabelle 11: Primer für NGS mit dem Roche GS Junior (Template: bisulfitekonvertierte DNA)

Gen	Primer	Templatespezifische Sequenz (5'-3')	Amplikonlänge	Chromosomale Lokalisierung (ENSEMBL release 85) Genstruktur	Anzahl der CpGs
MEG3 IG-DMR	Forward	^a GGGTGTA AAAAGTTATTTGGGATTAG	312 bp	Chr. 14:100.809.296-100.809.608 <i>DLK1-GTL2</i> intergenic (primary) DMR	8 (5)
	Reverse	^b ACCAAATACTAACTACTCTTAAACA			
MEST	Forward	^a GATTTAAAGGATAGTTTATAGTAT	296 bp	Chr. 7:130.492.924-130.493.220 Promotor ENSR00000069136	22
	Reverse	^b ACCAAATAAACAATCCCTAC			

bp: Basenpaare; Chr.: Chromosom; CpG: Cytosin-phosphatidyl-Guanin Dinukleotid; IG-DMR: intergenic differentially methylated region; NGS: next generation sequencing.

^a upstream Universal-Adapter 1: CTTGCTTCTGGCACGAG

^b upstream Universal-Adapter 2: CAGGAAACAGCTATGAC

Tabelle 12: MID-Primer für library barcoding mit dem Roche GS Junior (Template: PCR-Produkt)

MID	Sequenz (5'-3')				
	AUT oder BUT	454 Titanium-Sequenz (A kursiv; B normal)	Key-Sequenz	Individuelle MID-Sequenz	Universal-Adapter (1 kursiv; 2 normal)
1	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	ACGAGTGC GT	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	ACGAGTGC GT	CAGGAAACAGCTATGAC
2	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	ACGCTCGACA	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	ACGCTCGACA	CAGGAAACAGCTATGAC
3	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	AGACGCACTC	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	AGACGCACTC	CAGGAAACAGCTATGAC
4	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	AGCACTGTAG	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	AGCACTGTAG	CAGGAAACAGCTATGAC
5	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	ATCAGACACG	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	ATCAGACACG	CAGGAAACAGCTATGAC
6	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	ATATCGCGAG	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	ATATCGCGAG	CAGGAAACAGCTATGAC
7	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	CGTGTCTCTA	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	CGTGTCTCTA	CAGGAAACAGCTATGAC
8	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	CTCGCGTGTC	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	CTCGCGTGTC	CAGGAAACAGCTATGAC
9	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	TAGTATCAGC	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	TAGTATCAGC	CAGGAAACAGCTATGAC
10	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	TCTCTATGCG	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	TCTCTATGCG	CAGGAAACAGCTATGAC
11	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	TGATACGTCT	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	TGATACGTCT	CAGGAAACAGCTATGAC
12	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	TACTGAGCTA	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	TACTGAGCTA	CAGGAAACAGCTATGAC

13	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	CATAGTAGTG	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	CATAGTAGTG	CAGGAAACAGCTATGAC
14	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	CGAGAGATAC	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	CGAGAGATAC	CAGGAAACAGCTATGAC
15	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	ATACGACGTA	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	ATACGACGTA	CAGGAAACAGCTATGAC
16	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	TCACGACTA	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	TCACGACTA	CAGGAAACAGCTATGAC
17	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	CGTCTAGTAC	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	CGTCTAGTAC	CAGGAAACAGCTATGAC
18	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	TCTACGTAGC	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	TCTACGTAGC	CAGGAAACAGCTATGAC
19	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	TGTACTACTC	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	TGTACTACTC	CAGGAAACAGCTATGAC
20	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	ACGACTACAG	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	ACGACTACAG	CAGGAAACAGCTATGAC
21	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	CGTAGACTAG	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	CGTAGACTAG	CAGGAAACAGCTATGAC
22	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	TACGAGTATG	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	TACGAGTATG	CAGGAAACAGCTATGAC
24	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	TAGAGACGAG	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	TAGAGACGAG	CAGGAAACAGCTATGAC
25	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	TCGTCGCTCG	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	TCGTCGCTCG	CAGGAAACAGCTATGAC
26	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	ACATACGCGT	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	ACATACGCGT	CAGGAAACAGCTATGAC
27	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	ACGCGAGTAT	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	ACGCGAGTAT	CAGGAAACAGCTATGAC

28	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	ACTACTATGT	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	<i>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC</i>	TCAG	ACTACTATGT	<i>CAGGAAACAGCTATGAC</i>
29	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	ACTGTACAGT	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	<i>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC</i>	TCAG	ACTGTACAGT	<i>CAGGAAACAGCTATGAC</i>
30	AUT	<i>CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA</i>	TCAG	AGACTATACT	<i>CTTGCTTCCTGGCACGAG</i>
	BUT	<i>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC</i>	TCAG	AGACTATACT	<i>CAGGAAACAGCTATGAC</i>

AUT: Primer A Universal Tag und 454 Titanium; BUT: Primer B Universal Tag und 454 Titanium; MID: multiplex identifiers.

Tabelle 13: Primer für NGS mit dem Illumina MiSeq (Template: bisulfitkonvertierte DNA)

Gen	Primer	Sequenz (5'-3')	Amplikonlänge	Chromosomale Lokalisierung (ENSEMBL release 85) Genstruktur	Anzahl der CpGs
<i>MEG3</i> IG-DMR	Forward	AAGTGTGGTGAATTATAGGGAATGA	398 bp	Chr. 14:100.809.096-100.809.494 <i>DLK1-GTL2</i> intergenic (primary) DMR	8 (5)
	Reverse	TTCAAATAAACTCCCACTCCTTAC			
<i>MEG3</i> Promotor	Forward	TTAGGAAATTTTTAGAAATTTGTTA	390 bp	Chr. 14:100.826.902-100.827.292 Promotor ENSR00000099925	17
	Reverse	ATAACCCCTAAAATCAATCCTTAC			
<i>MEST</i>	Forward	AGTTATTGTTGTAGTATGATTTAGGATTTT	476 bp	Chr. 7:130.492.721-130.493.197 Promotor ENSR00000069136	33
	Reverse	CAACATAACAATTTAATCACATC			
<i>PEG3</i>	Forward	TTTTGGGGTTGTATTTTATTATTTAATT	408 bp	Chr. 19:56.840.575-56.840.983 Promotor ENSR00000349150	26
	Reverse	ACTCACCTCACCTCAATACTAC			

bp: Basenpaare; Chr.: Chromosom; CpG: Cytosin-phosphatidyl-Guanin Dinukleotid; IG-DMR: intergenic differentially methylated region; NGS: next generation sequencing.

Tabelle 14: Index-Primer für library barcoding mit dem Illumina MiSeq (Template: PCR-Produkt)

Index NEBNext	NEB#	Sequenz (5'-3')	Index-Sequenz innerhalb des Primers
i501	#E7603A	ATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATC*T	TATAGCCT
i502	#E7604A	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATAGAGGCACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATC*T	ATAGAGGC
i503	#E7605A	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGCTCTGAACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATC*T	CCTATCCT
i504	#E7606A	ATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGCTCTGAACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATC*T	GGCTCTGA
i505	#E7607A	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGGCGAAGACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATC*T	AGGCGAAG
i506	#E7608A	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAATCTTAACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATC*T	TAATCTTA
i507	#E7609A	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCAGGACGTACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATC*T	CAGGACGT
i508	#E7610A	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGACTGACACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATC*T	GTACTGAC
i701	#E7611A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGAGTAATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATC*T	ATTACTCG
i702	#E7612A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTCCGGAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATC*T	TCCGGAGA
i703	#E7613A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAATGAGCGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATC*T	CGTCATT
i704	#E7614A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGAATCTCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATC*T	GAGATTCC
i705	#E7615A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTGAATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATC*T	ATTCAGAA
i706	#E7616A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACGAATTCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATC*T	GAATTCGT
i707	#E7617A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGCTTCAGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATC*T	CTGAAGCT
i708	#E7618A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGCATTAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATC*T	TAATGCGC
i709	#E7619A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCATAGCCGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATC*T	CGGCTATG
i710	#E7620A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTCGCGGAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATC*T	TCCGCGAA
i711	#E7621A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGCGAGAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATC*T	TCTCGCGC
i712	#E7622A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTATCGCTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATC*T	AGCGATAG

Die i501-i508 Primer entsprechen den forward Primern, die i701-i712 Primer den reverse Primern.

Tabelle 15 enthält die Primer-Sequenzen für die reverse Transkription quantitative Echtzeit PCR (RT-qPCR), die von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bezogen wurden. Angelehnt an die MIQE Guidelines [197] wurden diese so konzipiert, dass forward und reverse Primer jeweils in unterschiedlichen Exons lagen (exon-exon junction spanning). Auf diese Weise kann gDNA-Kontamination sichtbar gemacht werden, da Introns in der cDNA herausgespleißt sind, während sie in der gDNA noch vorliegen und mit amplifiziert werden. Das Primer-Design erfolgte mit Primer3Plus [198] unter den folgenden Grundeinstellungen: Primer Länge: 18 - 22 bp, Produkt Größe: 80 - 95 bp, Schmelztemperatur: 58 - 62 °C, maximale zugelassene Anzahl an Mononukleotiden: 4. Bei dem Primer-Design für *MEST* wurde sich an Pedersen et al. (Cancer Research, 1999) [199] orientiert.

Tabelle 15: Primer für RT-qPCR (Template: nicht bisulfitkonvertierte DNA)

Gen	Primer	Sequenz (5'-3')	Amplikonlänge[bp]	Transkript/Exons
<i>MEG3</i>	Forward	GGCCTCTCGTCTCCTTCCT	80	MEG3-025 ENST0000556736
	Reverse	GGGTCCCACATTCGAGGTC		Exon 6/7
<i>MEST 1</i>	Forward	ATGAGGGAGTGGTGGGTCC	88	MEST-001 ENST00000223215.4
	Reverse	CAGGGGAGAGCTGAGGGG		Exon 2
<i>MEST 2</i>	Forward	GTCCTGTAGGCAAGGTCTTACC	90	MEST-002 ENST00000341441.5
	Reverse	AGGTACGCAGCAAGCAGG		Exon 1/2
Reference Gene				
<i>GAPDH</i>	Forward	TGCACCACCAACTGCTTAGC	87	GAPDH-001 ENST00000229239
	Reverse	GGCATGGACTGTGGTCATGAG		Exon 7/8
<i>HPRT1</i>	Forward	TGACTGCGCAAAACAATGCA	94	HPRT1-201 ENST00000298556.7
	Reverse	GGTCCTTTTACCAGCAAGCT		Exon 6/7
<i>IPO8</i>	Forward	CGAGCTAGATCTTGCTGGGT	87	IPO8-201 ENST00000256079.8
	Reverse	CGCTAATTCAACGGCATTCTT		Exon 13/14
<i>RPLP0</i>	Forward	GAACACCATGATGCGCAAGG	80	RPLP0-202 ENST00000313104.9
	Reverse	CCCGGATATGAGGCAGCA		Exon 3/4

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation genomischer DNA

Die Gewinnung der DNA aus dem fetalen Nabelschnurblut (FCB) erfolgte nach dem Herstellerprotokoll des FlexiGene DNA Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland), einer schnellen und einfachen Methode genomische DNA mit einer Länge von bis zu 150 kb aufzureinigen (siehe Abbildung 7). Reine DNA kann für vielseitige Downstream-Anwendungen eingesetzt werden und ist nahezu unbegrenzt bei 2-8°C oder -20°C lagerbar. Als Startmaterial wurden 500 µl FCB eingesetzt. Das FCB war nach der Entnahme in EDTA-gepufferten Röhrchen bei -80 °C gelagert worden und wurde schonend in einem 37 °C temperierten Wasserbad aufgetaut. Abweichend von den Herstelleranweisungen wurden die Zentrifugationsschritte während der gesamten Prozedur von 20 s auf 1 min ausgedehnt. Außerdem wurde die Zugabe des FG1 Puffers mit anschließender Zentrifugation und Abnahme des Überstandes einmal zusätzlich wiederholt, um die DNA-freien Blutkomponenten noch gründlicher auszuwaschen. Durch die Proteinase K Inkubation bei 65 °C im Heizblock wurden die Proteine verdaut, was sich in einem Farbumschlag von dunkelrot zu olivgrün äußerte. Die Zugabe des Isopropanols und das intensive Mischen durch kräftiges manuelles Schütteln präzipitierte die DNA, die dann in einem durchsichtig-weißlichen Klumpen sichtbar wurde. Die DNA wurde an der Luft getrocknet und anschließend in FG3 Puffer resuspendiert. Aufgrund sehr hoher DNA-Konzentrationen (bis zu 800 ng/µl) wurde die Resuspension von ursprünglich einer Stunde auf einen gesamten Tag Inkubation auf dem Heizblock verlängert. Um mögliche Evaporation zu vermeiden wurden die einzelnen Tubes dabei mit Parafilm abgedichtet. Ist die DNA hochkonzentriert und sehr viskos, kann das Pipettieren dadurch erschwert sein, weshalb solche Proben in einem zusätzlichen Verdünnungsschritt 1:1 oder 1:5 verdünnt und anschließend mit dem NanoDrop 2000c Spectrophorometer (VWR, Darmstadt, Deutschland) und dem Qubit Fluorometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) gemessen wurden. Für die normale Bisulfitkonvertierung wurde von jeder Probe 1 µg DNA eingesetzt, 0,5 µg für Arrays.

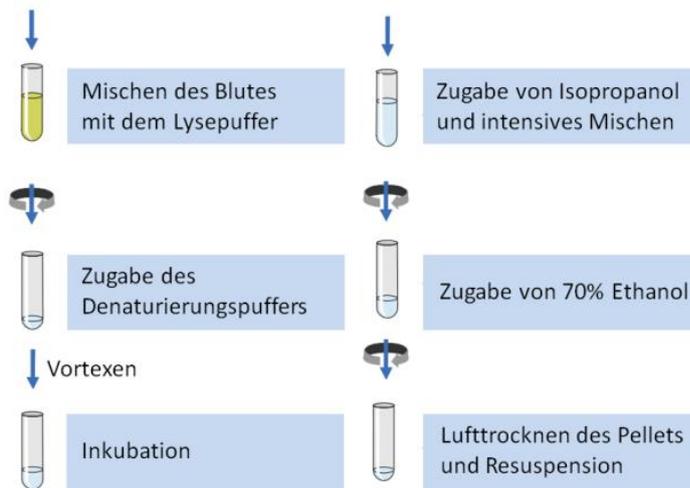


Abbildung 7: Ablauf der FlexiGene DNA Isolation

Abbildung übernommen aus dem FlexiGene DNA Handbook, Stand Mai 2010 und modifiziert (<https://www.qiagen.com/kr/resources/resourcedetail?id=6b147421-7846-411e-9993-bb01563b807e&lang=en>).

2.2.2 Bisulfitkonvertierung

Um den Methylierungsgrad von DNA messen zu können, müssen methylierte und unmethylierte Cytosine innerhalb von DNA-Sequenzen voneinander unterscheidbar gemacht werden [200]. Die Bisulfitkonvertierung stellt dabei die Standardmethode dar und basiert auf der chemischen Modifikation unmethylierter Cytosine durch Natriumbisulfit (auch: Natriumhydrogensulfit, NaHSO_3) [201]. Über eine hydrolytische Desaminierung wird nichtmethyliertes Cytosin in Uracil konvertiert wie in Abbildung 8 dargestellt ist. Die entstandenen Uracile werden bei einer anschließenden PCR als Thymin amplifiziert, wodurch sich die Basensequenz nach einer anschließenden Sequenzierung deutlich von der Ausgangssequenz bzw. Referenzsequenz unterscheiden lässt (siehe Abbildung 8). Methylierte Cytosine sind durch ihre Methylgruppe (CH_3) geschützt und bleiben deshalb von der NaHSO_3 -Behandlung unbeeinträchtigt [201]. Infolge der Bisulfitkonvertierung verlieren ursprünglich komplementäre Sense- und Antisense-DNA-Stränge ihre Komplementarität, lagern sich nicht mehr automatisch aneinander und liegen deshalb auch bei Raumtemperatur einzelsträngig vor.

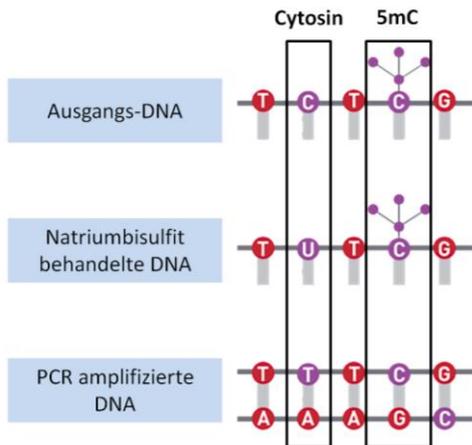
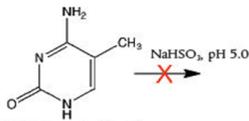


Abbildung 8: Basensequenzveränderung durch Bisulfitkonvertierung

Abbildung übernommen und modifiziert nach <https://www.diagenode.com/applications/dna-bisulfite-conversion>; 5mC: 5-Methylcytosin.

Auch unter *in vivo* Bedingungen kann es zu spontanen Abspaltungen der Methylgruppen kommen. Um daraus folgenden potenziell mutagenen Basenaustauschen (Transitionen) bei der nächsten DNA-Replikation vorzubeugen, werden diese Fehler jedoch durch zelleigene Reparaturmechanismen korrigiert. Chemisch gesehen katalysiert die Natriumbisulfit-Inkubation eine Desaminierungsreaktion, die in Abbildung 9 dargestellt ist und in drei Schritte unterteilt werden kann. Über eine reversible Sulfonierungsreaktion wird im ersten Schritt Natriumbisulfit an das Kohlenstoffatom 6 des Cytosins addiert. Dieser Schritt findet im sauren Milieu (pH 5,0) statt und die DNA muss zuvor durch Hitze denaturiert worden sein. Bei der hydrolytischen Desaminierung am 4. Kohlenstoffatom wird durch Abspaltung eines Ammoniak-Moleküls eine Ketogruppe und damit ein Uracil-Sulphonat gebildet. Bei der Desulfonierung wird das gebundene Natriumbisulfit wieder frei gesetzt und Uracil entsteht. Diese Reaktion findet im alkalischen Milieu statt. Auch 5-Methylcytosin (5mC) wird durch Natriumbisulfit desaminiert. Diese Reaktion erfolgt jedoch erheblich langsamer als die Desaminierung von nichtmethyliertem Cytosin und kann innerhalb der Inkubationszeit der verwendeten Kits (6-18 h) ausgeschlossen werden. Die vergleichsweise harschen Bedingungen während einer Bisulfitkonvertierung (Hitze, hohe Salzkonzentrationen, niedriger pH-Wert) führen zu einer starken Degradierung und Fragmentierung der DNA, was das anschließende Arbeiten erheblich anspruchsvoller macht, als das Arbeiten mit unkonvertierter DNA.

A) Natriumbisulfit-Behandlung von 5-Methylcytosin



5-Methylcytosin (5mC)

B) Natriumbisulfit-Behandlung von nichtmethyliertem Cytosin

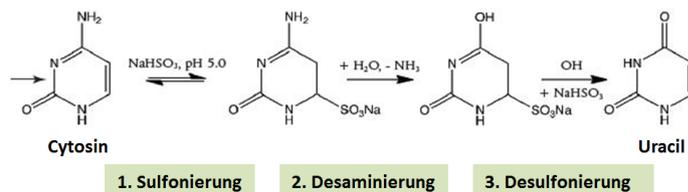
**Abbildung 9: Chemische Reaktion der Bisulfitkonvertierung von Cytosin**

Abbildung übernommen und modifiziert nach <http://www.neb-online.de/neb/epigenetik/epimark-kits/#!>; 5mC: 5-Methylcytosin.

Für die Pyrosequenzierung und NGS wurde die Bisulfitkonvertierung mit dem EpiTect Fast 96 Bisulfite Conversion Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die Array-Proben wurden mit dem EZ 96 DNA Methylation Kit (Zymo Research, CA, USA) konvertiert. Dabei wurde jeweils nach Herstellerangaben vorgegangen. Bisulfitkonvertierte DNA kann bis zu 6 Monate bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Routinemethode, um einen definierten DNA-Sequenzabschnitt *in vitro* zu amplifizieren. Es handelt sich um eine Kettenreaktion, da die Produkte eines vorhergegangenen Zyklus als Template für nachfolgende Zyklen dienen und die DNA-Fragmente daher exponentiell angereichert werden. Mit Hilfe von zwei flankierenden Primern (Forward und Reverse) werden Start- und Endpunkt der DNA-Synthese spezifisch festgelegt. Eine hitzestabile DNA-Polymerase (Extremozym) ist dabei das replizierende Enzym. Man verwendet üblicherweise eine Taq-Polymerase, die aus einem in Geysiren vorkommenden Bakterium namens *Thermus aquaticus* isoliert wurde [202]. In dieser Arbeit wurde aber auch die Pfu-Polymerase aus dem Bakterium *Pyrococcus furiosus* verwendet, die im Gegensatz zu der Taq-Polymerase eine Korrekturlese-Funktion besitzt und daher sequenzexakte DNA-Amplifikate mit glatten Enden (blunt-ends) ohne 3'-Adenosylüberhänge liefert. Die optimale Arbeitstemperatur von Taq-Polymerasen liegt mit

72 °C etwas höher als die der Pfu-Polymerasen mit 68 °C. Damit die DNA-Polymerase neue DNA synthetisieren kann, benötigt man außerdem Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs) und einen Puffer, der Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) enthält. Magnesiumionen dienen als Cofaktoren und bilden zusammen mit den dNTPs Komplexe, die der DNA-Polymerase als Substrat dienen. Jeder PCR-Zyklus besteht aus drei essentiellen Schritten, der Denaturierung (melting), der Primerhybridisierung (annealing) und der Polymerisation (elongation). Durch Erhitzung der doppelsträngigen DNA auf ca. 95 °C kommt es zur Denaturierung, d.h. zur Auftrennung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Einzelsträngen der DNA-Doppelhelix. Damit sich die Primer an die nun einzelsträngige DNA anlagern können, wird die Temperatur danach auf 50 - 65 °C reduziert (3 - 5 °C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer). Nach dem Primer-Annealing folgt die Elongation bei einer Temperatur von 68 - 72 °C. In diesem Schritt werden neue DNA-Stränge synthetisiert, ausgehend vom 3' - Ende des Primers. Zu Beginn eines Versuchs werden die PCR-Bedingungen für jedes Amplikon einzeln ausgetestet und optimiert. Über Gradienten-PCRs kann die optimale Primer-Annealingtemperatur ermittelt werden, die Konzentrationen an Nukleotiden und Magnesiumchlorid im Mastermix kann variiert werden und die Zyklenzahl wird individuell festgelegt, sodass die gewünschte DNA-Konzentration erreicht wird. Tabelle 16 bis Tabelle 19 geben die exakten PCR-Konditionen für die Amplifikation der in dieser Arbeit untersuchten Gene wieder. Für die Genotypisierungs-PCRs diente genomische, unkonvertierte DNA als Template, für die Pyrosequenzierungs- und die DBS-PCRs jeweils genomische bisulfitkonvertierte DNA. Die PCR-Schritte 2 bis 4 werden im Zuge der PCR mehrfach wiederholt, die genaue Zyklenzahl ist ebenfalls für jedes Amplikon verzeichnet. Nach der PCR können die Produkte bis auf Weiteres bei 4 °C oder bei -20 °C gelagert werden. Bei beiden NGS-Ansätzen wurde eine amplikonspezifische erste PCR durchgeführt, die der Vervielfältigung der Zielregion innerhalb eines Gens diente. Die PCR-Produkte verschiedener Gene wurden dann gepoolt und von einer zweiten PCR gefolgt, in der die Pools gebarcoded amplifiziert wurden. Für die zweite PCR mit dem Illumina MiSeq (Tabelle 19) wurde für jeden Durchlauf eine eigene Ligationseffizienz-PCR zur Bestimmung einer geeigneten Zyklenzahl durchgeführt. Eine Überamplifikation, die eventuell zur Generierung von unspezifischen Nebenprodukten führen kann, wurde damit ausgeschlossen. Der hier verwendete Mastermix (inklusive der Template-DNA) wurde auf mehrere Reaktionsansätze aufgeteilt, die dann mit

unterschiedlich vielen Zyklen amplifiziert wurden. Für die finale PCR wurde hier die Pfu-Polymerase verwendet.

Tabelle 16: PCR-Bedingungen für die Genotypisierung

PCR Schritt	Funktion	Temp.	Amplikonspezifische Dauer, Primer-Annealing Temperatur und Zyklenzahl			
			<i>MEG3</i> IG-DMR	<i>MEG3</i> Promotor	<i>MEST</i>	<i>PEG3</i>
1	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	5 min	5 min	5 min
2	Denaturierung	95 °C	30 s	30 s	30 s	30 s
3	Primer-Annealing	genspezifisch	30 s (59 °C)	30 s (59 °C)	30 s (59 °C)	30 s (62 °C)
4	Elongation	72 °C	45 s	45 s	45 s	45 s
5	Finale Elongation	72 °C	10 min	10 min	10 min	10 min
6	Lagerung	4 °C	∞	∞	∞	∞
Zyklenzahl Wdh. 2-4			38	38	38	38

∞: Unendlichzeichen; PCR: Polymerase Chain Reaction; Temp.: Temperatur; Wdh.: Wiederholung

Tabelle 17: PCR-Bedingungen für die Pyrosequenzierung

PCR Schritt	Funktion	Temp.	Amplikonspezifische Dauer, Primer-Annealing Temperatur und Zyklenzahl					
			<i>ADAP1</i>	<i>ATP5A1</i>	<i>HIF3A</i>	<i>MFAP4</i>	<i>PRKCH</i>	<i>SLC17A4</i>
1	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min
2	Denaturierung	95 °C	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s
3	Primer-Annealing	genspezifisch	30 s (63 °C)	30 s (57 °C)	30 s (60 °C)	30 s (58 °C)	30 s (55 °C)	30 s (58 °C)
4	Elongation	72 °C	45 s	45 s	45 s	45 s	45 s	45 s
5	Finale Elongation	72 °C	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min
6	Lagerung	4 °C	∞	∞	∞	∞	∞	∞
Zyklenzahl Wdh. 2-4			40	43	38	43	43	43

∞: Unendlichzeichen; PCR: Polymerase Chain Reaction; Temp.: Temperatur; Wdh.: Wiederholung

Tabelle 18: PCR-Bedingungen für DBS mit dem Roche GS Junior

PCR Schritt	Funktion	Temp.	Amplikonspezifische Dauer, Primer-Annealing Temperatur und Zyklenzahl			
			Erste PCR		Zweite PCR	
			<i>MEG3</i> IG-DMR	<i>MEST</i>	Temp.	<i>MEG3</i> IG-DMR/ <i>MEST</i>
1	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	15 min	95 °C	10 min

2	Denaturierung	95 °C	30 s	30 s	95 °C	20 s
3	Primer-Annealing	genspezifisch	30 s	1 min	72 °C	30 s
			(60 °C)	(54 °C)		
4	Elongation	72 °C	45 s	1 min		
5	Finale Elongation	72 °C	10 min	10 min	72 °C	7 min
6	Lagerung	4 °C	∞	∞	8 °C	∞
Zyklenzahl Wdh. 2-4			50	40		40

∞: Unendlichzeichen; PCR: Polymerase Chain Reaction; Temp.: Temperatur; Wdh.: Wiederholung

Tabelle 19: PCR-Bedingungen für DBS mit dem Illumina MiSeq

PCR Schritt	Funktion	Temp.	Amplikonspezifische Dauer, Primer-Annealing Temperatur und Zyklenzahl					
			Erste PCR				Zweite PCR	
			MEG3 IG-DMR	MEG3 Promotor	MEST	PEG3	Temp.	Pools
1	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	5 min	5 min	5 min	92 °C	2 min
2	Denaturierung	95 °C	30 s	30 s	30 s	30 s	92 °C	30 s
3	Primer-Annealing	genspezifisch	30 s	30 s	30 s	30 s	65 °C	30 s
			(60 °C)	(53 °C)	(60 °C)	(57 °C)		
4	Elongation	72 °C	60 s	60 s	60 s	60 s	68 °C	45 s
5	Finale Elongation	72 °C	10 min	10 min	10 min	10 min	68 °C	7 min
6	Lagerung	4 °C	∞	∞	∞	∞	8 °C	∞
Zyklenzahl Wdh. 2-4			43	45	43	45		16-22*

∞: Unendlichzeichen; PCR: Polymerase Chain Reaction; Temp.: Temperatur; Wdh.: Wiederholung

* über eine vorangestellte Ligationseffizienz-PCR wurde bei jedem Durchlauf die optimale Zyklenzahl ermittelt

Für Methylierungsmessungen mittels Pyrosequenzierung bzw. NGS wurden die PCRs mit Hilfe von Standard-DNAs etabliert (EpiTect PCR Control DNA Set (Qiagen, Hilden, Deutschland)). Dazu wurde künstlich methylierte DNA mit künstlich unmethylierter DNA in dem Verhältnis vermischt, dass die Kontroll-DNAs 0%, 25%, 50%, 75% und 100% Methylierung aufwiesen und die Verlässlichkeit der Messungen für jedes Assay überprüft werden konnte. Für einen üblichen PCR-Ansatz wurde ein Reaktionsvolumen von 25 µl gewählt und das FastStart Taq DNA Polymerase System (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) verwendet. Für alle außer einem Assay wurde die PCR mit MgCl₂-haltigem Puffer angesetzt. Die einzige Ausnahmen bildete die erste PCR für DBS (Roche GS Junior) für MEG3 IG-DMR (Tabelle 20). Die Angaben für den PCR-Mastermix beziehen sich auf das

Reaktionsvolumen, das für eine einzelne Probe benötigt wird. Für jede PCR wurden gleichzeitig Negativkontrollen angesetzt, bei denen zum Mastermix kein DNA-Template zugegeben wurde. Sie zeigen gegebenenfalls auftretende Verunreinigung des Mastermixes an. PCRs in denen die Negativkontrollen kontaminiert waren, wurden von der Sequenzierung ausgeschlossen, da unspezifisch amplifiziertes Produkt enthalten sein könnte.

Tabelle 20: PCR-Mastermix für einen Ansatz

Reaktionsansatz mit MgCl ₂ -haltigem Puffer		Reaktionsansatz mit MgCl ₂ -freiem Puffer	
Reagenz (Konzentration)	Volumen für einen 1x Ansatz [25 µl]	Reagenz (Konzentration)	Volumen für einen 1x Ansatz [25 µl]
10x PCR-Puffer mit MgCl ₂	2,5 µl	10x PCR-Puffer ohne MgCl ₂	2,5 µl
		Extra MgCl ₂ (20 mM)	4,0 µl
PCR Grade Nucleotide Mix ¹ (jede Base 10 mM)	0,5 µl	PCR Grade Nucleotide Mix (jede Base 10 mM)	0,5 µl
Forward Primer (10 µM) ²	1,0 µl	Forward Primer (10 µM)	1,0 µl
Reverse Primer (10 µM) ²	1,0 µl	Reverse Primer (10 µM)	1,0 µl
FastStart Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0,2 µl	FastStart Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0,2 µl
Template DNA ³ (20-100 ng/µl)	1,0 µl	Template DNA (20-100 ng/µl)	1,0 µl
H ₂ O	Ad 25 µl	H ₂ O	Ad 25 µl

Ausnahmen:

¹ Für die Pyrosequenzierungsassays wurde 1,0 µl PCR Grade Nucleotide Mix eingesetzt (*HIF3A* und *ADAP1* ausgeschlossen)

² Für DBS (Illumina MiSeq) *MEG3* Promotor wurden nur 0,8 µl der beiden Primer verwendet

³ Für *SLC17A4* (Pyro) wurden 2,0 µl Template DNA eingesetzt

Für DBS mit dem Roche GS Junior wurde die erste PCR (für *MEST*) und die zweite PCR (für *MEST* und *MEG3* IG-DMR) mit dem HotStarTaq Mastermix Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) angesetzt. Die erste PCR wurde mit sequenzspezifischen Primern und genomischer bisulfitkonvertierter DNA in einem 25 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Für die zweite PCR wurden 3 µl des PCR-Produktes der ersten PCR eingesetzt und mit Hilfe der multiplex identifiers (MIDs) der 29 AUT und BUT Primerpaare gebarcodet.

Tabelle 21: PCR-Mastermix für DBS mit dem Roche GS Junior unterteilt in erste und zweite PCR

Erste PCR mit assayspezifischen Primern		Zweite PCR mit AUT und BUT Primern	
Reagenz (Konzentration)	Volumen für einen 1x Ansatz [25 µl]	Reagenz (Konzentration)	Volumen für einen 1x Ansatz [50 µl]
HotStarTaq Mastermix Kit	12,5 µl	HotStarTaq Mastermix Kit	25 µl
Forward Primer (10 µM)	0,5 µl	AUT Primer (10 µM)	1,0 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,5 µl	BUT Primer (10 µM)	1,0 µl
Template DNA (20-100 ng/µl)	1,0 µl	PCR-Produkt aus der ersten PCR	3,0 µl
H ₂ O	Ad 25 µl	H ₂ O	Ad 50 µl

AUT: Primer A Universal Tag und 454 Titanium; BUT: Primer B Universal Tag und 454 Titanium

Vor der finalen PCR mit der PfuTurbo C_x Hotstart DNA Polymerase (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) wurde eine Ligationseffizienz PCR zur genauen Bestimmung der optimalen Zyklenzahl durchgeführt. Dazu wurden einige beliebige forward (NEBNext i501-i508) und reverse (NEBNext i701-i712) Primer-Kombinationen gewählt und der Reaktionsansatz (Volumen 50 µl) inklusive der zugegebenen Pool-Template-DNA auf 4 Reaktionsgefäße je 10 µl aufgeteilt. Als Zyklenzahlen wurden 16, 18, 20 und 22 getestet. Um einen repräsentativen Überblick zu bekommen, wurde die Test-PCR mit 3-4 verschiedenen Pools angesetzt. In einem 1,5 %igen Agarosegel wurde die optimale Amplifikation überprüft und diese Zyklenzahl entsprechend für die finale PCR verwendet. Für die Ligationseffizienz PCR und die finale PCR wurde der TruSeq Index Plate Fixture (Illumina, San Diego, USA) genutzt (siehe Abbildung 10).

Tabelle 22: PCR-Mastermix für DBS mit dem Illumina MiSeq (zweite PCR)

Ligationseffizienz PCR		Zweite PCR	
Reagenz (Konzentration)	Volumen für einen 1x Ansatz [50 µl]	Reagenz (Konzentration)	Volumen für einen 1x Ansatz [50 µl]
10x PCR-Puffer mit MgCl ₂	5,0 µl	10x Pfu Turbo C _x Polymerase Puffer	5,0 µl
PCR Grade Nucleotide Mix (jede Base 10 mM)	0,5 µl	PCR Grade Nucleotide Mix (jede Base 10 mM)	0,5 µl
Forward Index Primer (10 µM) (i501-i508)	1,0 µl	Forward Primer (10 µM) (i501-i508)	1,0 µl

Reverse Index Primer (10 µM) (i701-i712)	1,0 µl	Reverse Primer (10 µM) (i701-i712)	1,0 µl
FastStart Taq DNA Polymerase (5U/µl)	1,0 µl	PfuTurbo C _x Hotstart DNA Polymerase (2,5 U/µl)	1,0 µl
DNA-Pool nach der Adapter Ligation	3,0 µl	DNA-Pool nach der Adapter Ligation	3,0 µl
H ₂ O	Ad 50 µl	H ₂ O	Ad 50 µl

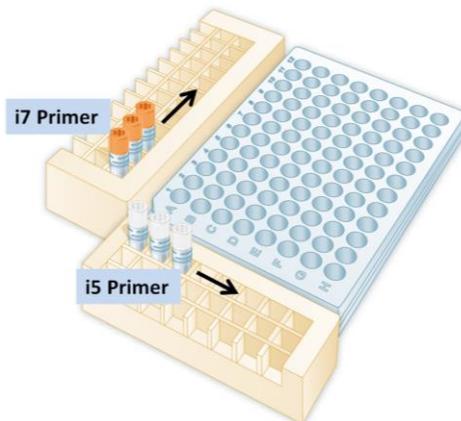
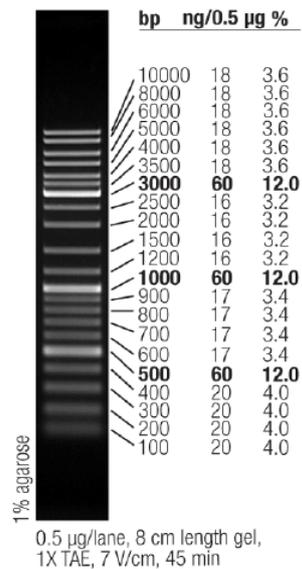


Abbildung 10: TruSeq Index Plate Fixture für die finale PCR

Abbildung übernommen von https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Protocols/C1A38CEF02DE4C6E8F70A6D00B1EC9A7/Content/PCR_plate.jpg und modifiziert.

2.2.4 Gelelektrophorese

Nach der Amplifikation der Ziel-Sequenz mittels PCR wurden alle Produkte einer gelelektrophoretischen Auftrennung unterzogen. Die Gelelektrophorese ist eine binäre, digitale Überprüfungsmethode, da dabei entweder ein PCR-Produkt oder kein PCR-Produkt vorliegt. Damit kann der generelle Erfolg der Amplifikation sowie die Fragmentgröße der generierten Produkte ermittelt werden. Darüber hinaus können aber auch unspezifische Nebenprodukte, Primerdimere oder Kontaminationen festgestellt werden, was diesen Überprüfungsschritt vor jeder Sequenzierung unerlässlich macht. Da Nukleinsäuren negativ geladen sind, wandern sie unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes von der Kathode zur Anode. Das in der Gelmatrix befindliche Fluoreszenz-Färbereagenz Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe, Deutschland) bzw. das ungiftigere HDGreen Plus (INTAS Science Imaging, Göttingen, Deutschland) interkaliert dabei in die DNA, wodurch die DNA-Banden unter einer Ultraviolet-Lampe (UV-Lampe) sichtbar gemacht werden können.

GeneRuler DNA Ladder Mix

Für ein 1,5%iges Agarosegel wurden 7,5 g pegGold Universal Agarose (VWR, Darmstadt, Deutschland) in 500 ml TAE-Puffer aufgekocht und 10 µl Ethidiumbromid bzw. 20 µl HDGreen Plus zugegeben. Von jeder Probe wurden 4 µl PCR-Produkt mit 6 µl 1x DNA Loading Dye (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard diente der 100 bp GeneRuler DNA Ladder Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) (siehe Abb. X). Die Laufzeit betrug zwischen 15 und 30 min bei 150-170 V.

Abbildung 11: Größenstandard DNA-Leiter

Abbildung übernommen und modifiziert nach <http://onsnetwork.org/blog/tag/ogeneruler-dna-ladder-mix/>.

2.2.5 Reverse Transkription quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR)

Für ein Subset der Viszeralfett-Kohorte, die in die Roche GS Junior Methylierungsstudie eingeschlossen war, wurde eine Expressionsuntersuchung mittels RT-qPCR durchgeführt. Nach der RNA Isolation wird diese mithilfe einer reversen Transkriptase (RT), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in cDNA umgeschrieben [203] und dient dann als Ausgangsmaterial für die spezifische Amplifikation der Zielsequenz mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase. Die cDNA ist zur ursprünglichen mRNA komplementär und im Gegensatz zu genomischer DNA (gDNA) Intron-frei. Über RT-qPCR lassen sich sowohl das Genexpressionsniveau als auch verschiedene Isoformen nachweisen (resultierend aus alternativem Spleißen). Die RT-qPCR beruht auf einem ähnlichen Vervielfältigungsprinzip wie eine herkömmliche Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Ein stöchiometrischer Einbau von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen in doppelsträngige PCR-Produkte ermöglicht darüber hinaus jedoch die Quantifizierung der amplifizierten DNA in Echtzeit. Proportional zur Menge der generierten PCR-Produkte nimmt auch die Fluoreszenz mit jedem Zyklus zu [204]. Eine Schmelzkurvenanalyse nach Beendigung der PCR ermöglicht die Bestimmung der genauen Fragmentlänge und damit eine Spezifizierung des Amplifikats. Der Ct-Wert (engl. cycle threshold) misst den Punkt, an dem die PCR in die exponentielle

Vervielfältigungsphase kommt und das Fluoreszenzsignal erstmals deutlich vom Hintergrundrauschen abgegrenzt werden kann. Für eine relative Quantifizierung (RQ) müssen technisch unvermeidbare Variationen in den Ausgangsmengen der eingesetzten cDNA zwischen den untersuchten Proben ausgeglichen und Unterschiede normalisiert werden. Dafür sind interne Kontrollen notwendig, auch Referenzgene (RG) oder Housekeeping-Gene (HKG) genannt, die als nicht-regulierte Haushaltsgene ubiquitär exprimiert werden und z.B. in den Grundstoffwechsel von Zellen involviert sind.

Die RNA Isolation erfolgte nach den Herstellerangaben mit dem RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). 2 µl RNA (durchschnittlich ca. 1200 ng) wurden verwendet um mit der SuperScript™ II reversen Transkriptase (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) cDNA herzustellen. Das Elutionsvolumen betrug dabei insgesamt 10 µl. Der 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Tartu, Estland) enthält alle für die q-PCR erforderlichen Komponenten: DNA Polymerase, qPCR Puffer, MgCl₂, dNTPs, EvaGreen und ROX Farbstoff. EvaGreen ist eine Alternative zum weit bekannten SYBRGreen. Da die RT-qPCR Primer so designt wurden, dass ihre Schmelztemperaturen sehr ähnlich (ungefähr bei 60 °C) lagen, konnte für alle Gene (und RGs) dasselbe Cyclerprogramm verwendet werden (Tabelle 23). Für die quantitative Messung wurde ein ABI Vii_a™ 7 (Applied Biosystems™, Forster City, USA) verwendet. Die Auswertung der Schmelz- und Amplifikationskurven sowie die relative Quantifizierung (RQ) der RT-qPCR Ergebnisse nach der $\Delta\Delta C_t$ Methode erfolgte mit Hilfe der QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.2.4 (Applied Biosystems™, Forster City, USA). Alle Proben wurden in technischen Triplets analysiert. Für jeden Durchlauf und jedes Primerpaar wurden Negativkontrollen ohne cDNA Template integriert. Als Referenzgene für die Normalisierung dienten: hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1 (*HPRT1*), importin 8 (*IPO8*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) und ribosomal large P0 (*RPLP0*). Alle häufig verwendete und für Fettgewebe empfohlene Housekeeping Gene (HKGs) [205]. Da RT-qPCR Studien weltweit in ihrem Aufbau und der Durchführung mitunter stark variieren, wurden zur Vereinheitlichung und besseren Reproduzierbarkeit die Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) etabliert [197]. Diese Studie wurde ebenso nach den MIQE-Kriterien entworfen.

Tabelle 23: RT-qPCR Mastermix und Cyclerprogramm

Mastermix		Cyclerprogramm			
Reagenz (Konzentration)	Volumen für einen 1x Ansatz [10 µl]	RT-qPCR Schritt	Funktion	Temp.	Dauer
cDNA	0,25 µl	1	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus	2,0 µl	2	Denaturierung	95 °C	15 s
Primer-Mix aus forward und reverse Primer (3,3 µM)	1,0 µl	3	Primer-Annealing	60 °C	20 s
H ₂ O	Ad 10 µl	4	Elongation	72 °C	20 s
		Die RT-qPCR Schritte 2-4 wurden insgesamt 40x wiederholt. Die finale Schmelzkurve startete bei 60°C und endete bei 95°C.			

2.2.6 Methoden zur Bisulfitsequenzierung

Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedene Bisulfitsequenzierungsmethoden durchgeführt, die Pyrosequenzierung, DBS mit zwei verschiedenen Sequenzierplattformen und unterschiedlichen Library-Präparierungs-Protokollen sowie ein Illumina Infinium HumanMethylation 450 K Array Experiment. Die Vor- und Nachteile der verwendeten Methoden sind Tabelle 24 zu entnehmen. Mit Ausnahme des Arrays basieren alle Methoden auf der Amplifikation bisulfitkonvertierter DNA durch PCRs. Dabei ist darauf zu achten, dass die Primer strangspezifisch konzipiert werden, da die Komplementarität von sense und antisense Strang durch die Konvertierung verloren geht. Um sicherzugehen, dass kein Amplifikationsbias zwischen (ursprünglich) methylierten und unmethylierten Molekülen entsteht, muss dabei darauf geachtet werden, dass keine CpGs innerhalb der Primerbindestellen liegen. Auch SNPs mit einer hohen MAF sind auszuschließen. In den folgenden Unterkapiteln wird detaillierter auf den Hintergrund und die technische Durchführung dieser Methoden eingegangen.

Tabelle 24: Vor- und Nachteile der verwendeten Bisulfite Sequenzierungsmethoden

	Pyro- sequenzierung	DBS mit dem Roche GS Junior	DBS mit dem Illumina MiSeq	Illumina Infinium HumanMethylation 450K Array
Sequenzierlänge	70 bp	300 bp	600 bp	genomweit (>480.00 Einzel-CpGs)
Quantifizierung der Ø-Methylierung	+++	+++	+++	++
Quantifizierung auf Einzelmolekülebene	-	+++	+++	-
Unterscheidung nach parentalen Allelen	+ (aber nur mit Spezialassay)	+++	+++	-
Anzahl der simultan prozessierbaren Proben	96	29	24 (erweiterbar auf 96)	12
Anzahl der simultan prozessierbaren Gene	theoretisch bis zu 96 (realistisch: 4-5)	2	10-15	genomweit
Zeitlicher Aufwand	+	++	+++	++
Finanzieller Aufwand	+	+++	++	+++

bp: Basenpaare; DBS: Deep Bisulfite Sequencing; Ø: Durchschnitt.

2.2.6.1 Illumina Infinium HumanMethylation 450 K Array

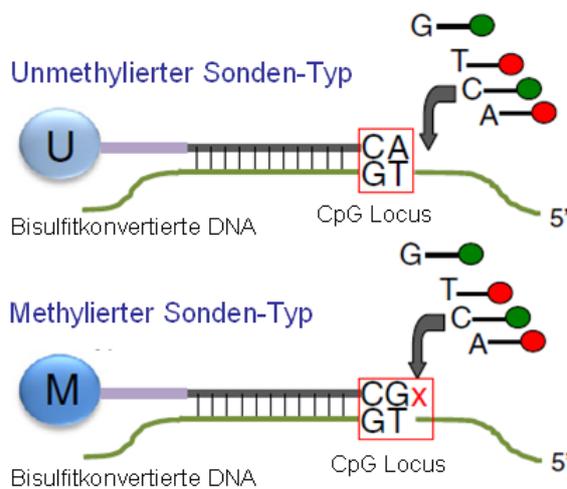
Der Illumina Infinium HumanMethylation 450 K Array (Illumina, San Diego, USA) eignet sich für epigenomweite Assoziationsstudien, da er über das komplette Genom hinweg quantitative Methylierungsanalysen auf der Ebene einzelner CpGs ermöglicht [206]. Er deckt dabei über 480.000 CpGs in 99 % der Referenz-Sequenz-Gene (RefSeq) und 96 % der CpG Inseln aus der University of California, Santa Cruz (UCSC) Datenbank ab [207]. Die RefSeq Datenbank ist eine open access Datenbank für DNA-, RNA- und Proteinsequenzen, die vom National Center for Biotechnology Information (NCBI) gepflegt wird. NCBI ist ein in Bethesda, Maryland angesiedeltes Institut für Datenspeicherung und Datenverarbeitung. Bei der UCSC-Datenbank handelt es sich um einen Genom Browser, der von der University of California unterhalten wird. Von 99 % der RefSeq-Gene sind auf dem BeadChip der Promotor, das erste Exon, der Gene Body, die 5' und 3' UTR (*engl.* "untranslated region") repräsentiert. Darüber hinaus deckt der Chip auch Regionen ab, die in unterschiedlichen Geweben verschieden methyliert sind (t-DMRs) sowie Promotoren von miRNAs. Für den Array wird die Infinium

Technologie verwendet, die auch schon für den Illumina 27K Methylierungsarray zum Einsatz kam. Bei dem Illumina 27K Methylierungsarray wurde jedoch nur Infinium I (Abbildung 12) angewandt, während der Illumina 450K Methylierungsarray zusätzlich Infinium II (Abbildung 13) verwendet [208]. Die beiden Infinium Assays unterscheiden zwischen unmethylierten und methylierten CpG Loci, indem unterschiedliche, 50 bp lange Sonden-Typen eingesetzt werden, an die mit Farbstoffen gekennzeichnete Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) angebaut werden. Didesoxycytidintriphosphat (ddCTP) und Didesoxyguanosintriphosphat (ddGTP) sind mit Biotin markiert und werden mit Streptavidin-markiertem Cy3 detektiert, Didesoxyadenosintriphosphat (ddATP) und Didesoxythymidintriphosphat (ddTTP) mit Dinitrophenyl (DNP), welches mit einem Cy5-gekennzeichneten Antikörper erkannt wird. Der Methylierungsgrad eines Locus kann ermittelt werden, indem man das Verhältnis der Fluoreszenzsignale für eine methylierte versus eine unmethylierte Stelle kalkuliert. Die absoluten Methylierungswerte (β -Werte) werden anschließend z.B. über die GenomeStudio Software (Illumina, San Diego, USA) berechnet [208]. Ein einzelner BeadChip kann mit 12 Proben befüllt werden.

2.2.6.1.1 Infinium I Assay

Bei dem Infinium I Assay (Abbildung 12) werden zwei unterschiedliche Sonden-Typen verwendet. Die M-Sonden wurden für methylierte CpG Loci designt, die U-Sonden für unmethylierte Loci. An die Sonden werden mit Farbstoffen markierte ddNTPs angebaut, wobei an einem CpG Locus für beide Sonden-Typen das gleiche ddNTP eingebaut wird, da sich die Inkorporation des ddNTP nach der ersten Base nach dem Cytosin des CpG Locus auf dem Template-Strang richtet. Aus diesem Grund wird das Signal für beide Sonden-Typen im gleichen Farbkanal detektiert. Die Anordnung der Sonden auf dem BeadChip wird vom Hersteller kodiert. Bindet eine U-Sonde an eine unmethylierte Zielsequenz kann eine Single-Base Extension erfolgen und damit ein Signal detektiert werden. Dies ist auch der Fall, wenn eine M-Sonde an eine methylierte Zielsequenz bindet. Bindet allerdings eine M-Sonde an eine unmethylierte Zielsequenz oder eine U-Sonde an eine methylierte Zielsequenz, so kommt es zu einem Single-Base Mismatch, wodurch eine Extension inhibiert wird.

Unmethylierter Locus



Methylierter Locus

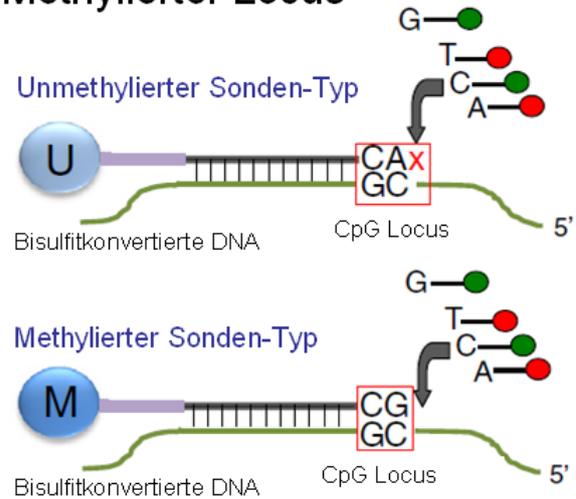


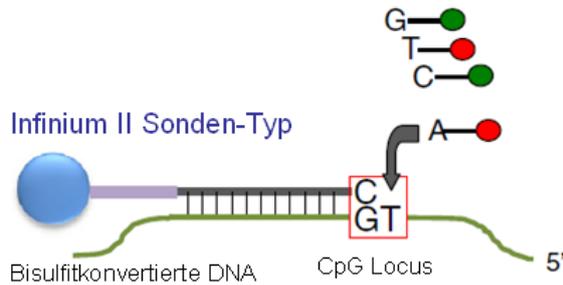
Abbildung 12: Infinium I Assay

Abbildung übernommen und modifiziert nach [207].

2.2.6.1.2 Infinium II Assay

Bei dem Infinium II Assay (Abbildung 13) wird nur ein einziger Sonden-Typ verwendet. Das 3' Ende der Sonde komplementiert die Base direkt upstream des Cytosins des CpG Locus. Bei der Single-Base Extension wird ein gelabeltes ddGTP oder ddATP angebaut, je nachdem, ob auf dem Template-Strang nach der Bisulfitkonvertierung ein „methyliertes“ C oder ein „unmethyliertes“ T steht. Für den Infinium II Assay werden die Signale für einen methylierten bzw. unmethylierten CpG Locus in zwei verschiedenen Farbkanälen detektiert, wobei ein rotes Signal für einen methylierten Locus und ein grünes Signal für einen unmethylierten Locus steht. Die Infinium II Technologie wurde entwickelt, um das Genom besser abzudecken und eine größere Erfassungsreichweite für den Illumina 450 K Methylierungsarray zu gewährleisten. Sie hat aber im Vergleich zu der Infinium I Technologie eine höhere β -Wert Variabilität und ist für Replikate schlechter reproduzierbar.

Unmethylierter Locus



Methylierter Locus

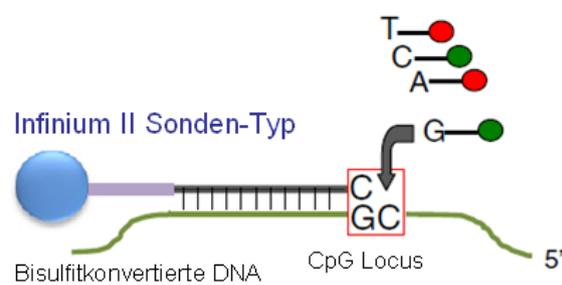


Abbildung 13: Infinium II Assay

Abbildung übernommen und modifiziert nach [207].

Die Kombination von Infinium I und Infinium II bei dem Illumina 450K Methylierungsarray ermöglicht die Analyse einer größeren Anzahl an CpG Loci. Insgesamt beinhaltet der Illumina 450K Methylierungsarray 485.577 CpG Loci (482.421 CpG sites, 3.091 non-CpG sites und 65 zufällige SNPs). Von den CpG Loci werden ein Drittel durch Infinium I und zwei Drittel durch Infinium II abgedeckt [207]. Innerhalb des Illumina Infinium HD Methylation Assays wird die Template-DNA genomisch amplifiziert (WGA), fragmentiert, gefällt und resuspendiert. Die DNA-Proben werden auf den BeadChip hybridisiert, wobei die unhybridisierte DNA nachträglich herunter gewaschen wird. Durch eine Single-Base Extension werden die an die DNA hybridisierten Sonden mit Hilfe von ddNTPs verlängert und markiert.

Die für den Illumina 450K Methylierungsarray selektierten Proben wurden mit einem Hexaplex auf mögliche Geschlechts-Mismatches und auf eine eventuelle Kontamination des FCBs mit mütterlichem Blut überprüft. Der Hexaplex ist ein in unserem Institut manuell etablierter kleiner Powerplex, der fünf intronische Repeats und das Amelogenin-Gen abdeckt. Er ermöglicht Verwandtschaftsanalysen und Geschlechtsbestimmungen. Es ist bekannt, dass Amelogenin eine wichtige Rolle im Mineralisierungsprozess der Amelogenese (der Bildung des Zahnschmelzes) spielt. Es sind zwei Amelogenin-Varianten bekannt, AMELX auf dem X-Chromosom Xp22.1-X.22.3 und AMELY auf dem Y-Chromosom Yp11.2, die sich in ihrer Länge um 6 bp unterschieden. Im Protokoll sind männliche Proben durch zwei Peaks und weibliche Proben durch einen (doppelt so hohen) Peak erkennbar. Da für den Microarray 500 ng DNA pro Probe auf den Chip geladen werden muss, wurde die DNA-Konzentration der aufgereinigten Proben mit dem Qubit dsDNA BR Assay Kit (ThermoFisher

Scientific, Waltham, USA) am Qubit Fluorometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt. Die Messung der Proben wurde vorgenommen wie im User Guide „Qubit dsDNA BR Assay Kits“ (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit_dsDNA_BR_Assay_UG.pdf) und in Abbildung 14 beschrieben. Diese fluoreszenzbasierte Quantifizierungsmethode ist besonders geeignet, um doppelsträngige DNA (dsDNA) nachzuweisen. Messbare DNA-Konzentrationen liegen im Bereich von 100 pg/μl bis 1000 ng/μl. Die dsDNA-Konzentration der Proben wird gemessen, indem deren relative Fluoreszenz algorithmisch mit der Fluoreszenz der beiden Standards verglichen wird. Die Bisulfitkonvertierung wurde mit dem EZ 96 DNA Methylation Kit (Zymo Research, CA, USA) nach Herstellerhandbuch durchgeführt (<http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/479/d5004i.pdf>).

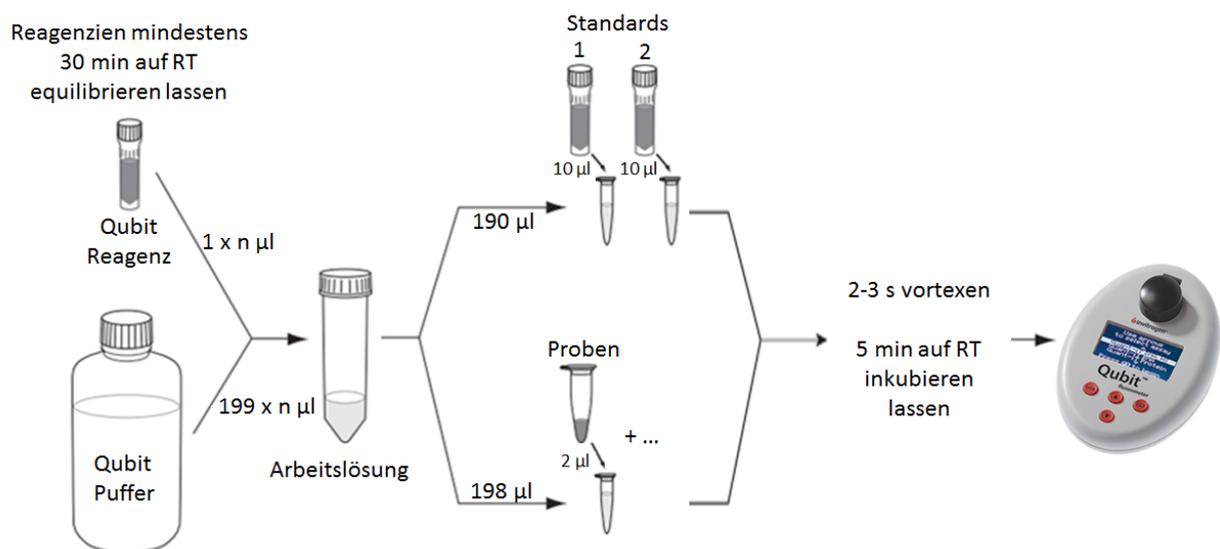


Abbildung 14: Qubit Workflow

Abbildung übernommen und modifiziert nach Applied BioProbes „iQuant™ BR dsDNA quantitation assay workflow“ und ThermoFisher Scientific „The Qubit® quantitation assay workflow“

RT: Raumtemperatur; n: Probenzahl.

Die Methylierungsarrays wurden nach den Herstellerinstruktionen angefertigt, wie im Illumina Infinium HD Methylation Assay Manual Protocol Experienced User Card beschrieben ([http://support.illumina.com/downloads/infinium_hd_methylation_assay_manual_euc_15019522_b\).html](http://support.illumina.com/downloads/infinium_hd_methylation_assay_manual_euc_15019522_b).html)) und mit dem Illumina iScan System gescannt (Illumina, San Diego, USA).

2.2.6.1.3 Array-Auswertung und Statistik

Die Daten wurden als idat files exportiert und mit RnBeads vorprozessiert. RnBeads ist ein benutzerfreundliches Tool für die Interpretation von DNA Methylierungsdaten (z.B. reduced representation bisulfite sequencing (RRBS), Infinium Arrays, whole genome bisulfite sequencing (WGBS),...) [209]. Mit dem Gene Ontology Enrichment Analysis and Visualization Tool (GORILLA) (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>) wurde eine GO terms Analyse durchgeführt. Um das epigenetische Alter der Proben bestimmen zu können, wurden Files mit GenomeStudio (Illumina, San Diego, Deutschland) angefertigt und mit der Horvath clock [210] (<https://labs.genetics.ucla.edu/horvath/dnamage/>) analysiert. Eine erweiterte Auswertung der Arraydaten wurde von der Bioinformatik-Abteilung der Universität Würzburg mit der BioConductor Plattform (Version 3.2) und R (Version 3.2.2) durchgeführt. Für die erforderliche Präprozessierung wurde das watermelon [211] und das minfi Packet [212] verwendet. Um echte Signale von Hintergrundrauschen unterscheiden zu können, wurden CpG Stellen mit unterschwelliger Signalstärke (Beadcount < 3; Detection p-Wert > 0.05) ausgeschlossen. Ebenso wie die Geschlechtschromosomen X/Y und Sonden, die bekannte häufige SNPs enthielten und deswegen erfahrungsgemäß oft zu Problemen führen. Die Datensätze wurden mit der Dasen-Methode normalisiert [211] und Sonden-bedingte Effekte mittels Beta Mixture Quantile Dilation (BMIQ) korrigiert [213]. Für Kohorte A überlebten insgesamt 452.932 CpGs und für Kohorte B 455.307 CpGs das Filtern (von ursprünglich 485.577 im Chip abgedeckten CpG Loci). Eine Metaanalyse über beide Arraykohorten hinweg lieferte eine Liste aus Kandidaten-Genen, die einen signifikanten Gruppenunterschied aufwiesen. Alle p-Werte wurden nach der Benjamini-Hochberg Methode multiplem Testen (MT) unterzogen.

2.2.6.2 Pyrosequenzierung zur Genotypisierung/Methylierungsquantifizierung

Die Pyrosequenzierung ermöglicht eine simultane Entschlüsselung der Basenabfolge (1) sowie eine Quantifizierung des Methylierungslevels (2) nahe beieinander liegender CpGs innerhalb einer Sequenz. Sie kann darüber hinaus auch für Genotypisierungsanalysen (3) herangezogen werden [214].

(1) Entschlüsselung der Basenabfolge:

Da mittels Pyrosequenzierung nur vergleichsweise kurze Abschnitte (bis zu 70 bp) sequenziert werden können, lohnen sich für längere Sequenzierungsvorhaben andere Methoden wie beispielsweise die Sanger-Sequenzierung. Es kommt auch zu Ungenauigkeiten bei der Signalerfassung, wenn Homopolymere vorliegen (bei bisulfitkonvertierter DNA häufig als T-Stretches).

(2) Quantifizierung des Methylierungslevels:

Die Pyrosequenzierung ist eine akkurate Hochdurchsatz-Methode zur zeit- und kostensparenden Generierung von Durchschnittsmethylierungswerten.

(3) Genotypisierungsanalysen:

Genotypisierungen (über den Bisulfit-vermittelten $Y = C/T$ Unterschied hinaus) ermöglichen die Präselektion von Proben, die für einen im Amplikon liegenden, informativen SNP heterozygot sind, indem ein bestimmter Ratio-Wert ermittelt wird. Dieser Schritt ist essentiell, wenn bei der Auswertung von NGS Daten nach der parentalen Herkunft unterschieden werden soll.

Die bioluminometrische Sequenzierung erfolgt in Echtzeit [215] nach dem „Sequencing-by-Synthesis“-Prinzip. Die bei der Synthese eines neuen DNA-Strangs nacheinander zugegebenen und eingebauten Nukleotide werden dabei durch Lichtemission detektiert und vermerkt [216]. In Abbildung 15 wird die Kaskade enzymatischer Reaktionen bei der Pyrosequenzierung aufgezeigt.

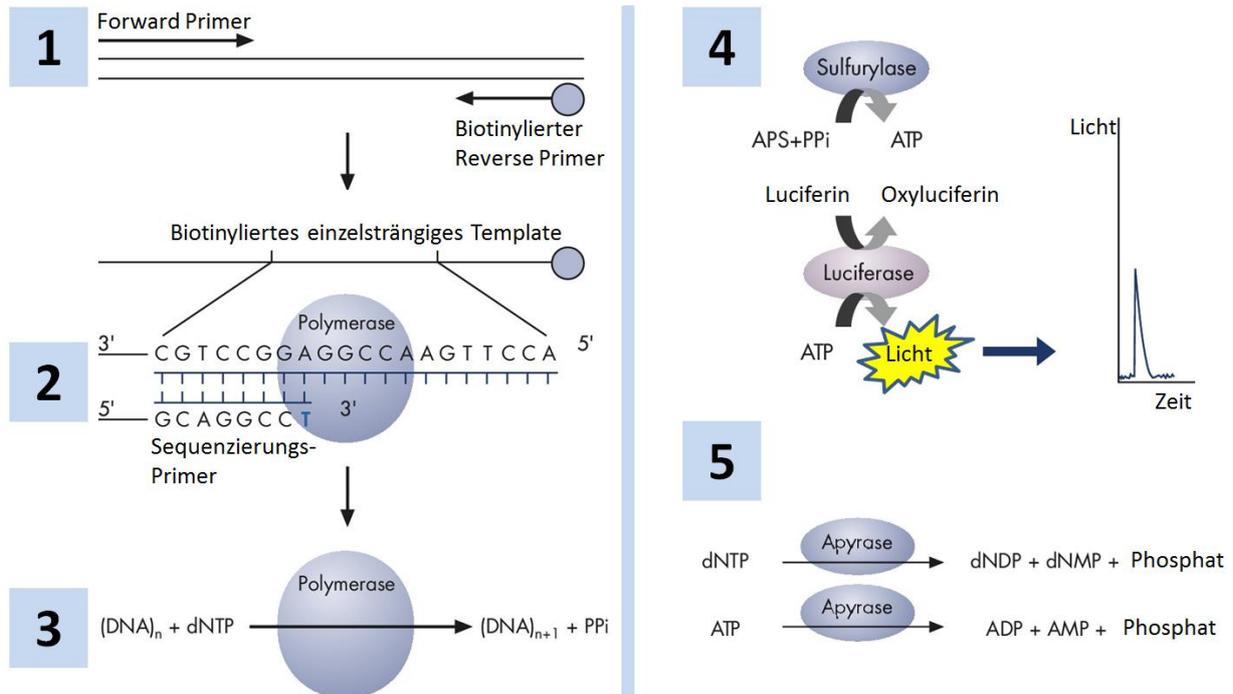


Abbildung 15: Pyrosequenzierungsprinzip

Abbildung übernommen von <https://www.qiagen.com/sg/resources/technologies/pyrosequencing-resource-center/technology-overview/#comparison> und modifiziert.

ADP: Adenosindiphosphat; AMP: Adenosinmonophosphat; ATP: Adenosintri-phosphat; APS: Adenosin-5'-phosphosulfat; dNTP: Desoxyribonukleosidtriphosphat; PPi: Pyrophosphat

Fünf Schritte der Pyrosequenzierungskaskade:

- (1) Für Methylierungsanalysen wird bisulfitkonvertierte DNA innerhalb einer PCR amplifiziert. Für Genotypisierungsanalysen diente nichtkonvertierte DNA als Ausgangsmaterial. Einer der beiden Primer (in Abbildung 15 der reverse Primer) ist am 5'-Ende mit einem Biotinrest versehen. Über eine Biotin-Streptavidin-Beadaufreinigung ist es möglich den markierten DNA-Strang zu isolieren, der nach der Denaturierung einzelsträngig als Pyrosequenzierungstemplate vorliegt.
- (2) Nachdem der Sequenzierungsprimer an das Pyrosequenzierungstemplate hybridisiert ist, wird ein Enzymmix aus den vier Enzymen DNA-Polymerase, Adenosintri-phosphat(ATP)-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase und den Substraten Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) und Luciferin zugegeben [216].
- (3) Nacheinander werden einzelne dNTPs zugegeben und von der DNA-Polymerase in den neuen Strang eingebaut, wenn sie komplementär zu der gegenüberliegenden Base im Template-Strang ist. Bei dem Einbau wird Pyrophosphat (PPi) frei. Die Menge an freigewordenem PPi ist proportional zu der Anzahl eingebauter Nukleotide.

- (4) Die ATP-Sulfurylase wandelt in Anwesenheit von APS das PPI in ATP um. Dieses wiederum wird von der Luciferase dazu verwendet Luciferin in Oxyluciferin zu oxidieren, wobei Licht entsteht, das von einer Charge Coupled Device (CCD)-Kamera detektiert und im Pyrogramm als Peak abgebildet wird. Steht in der Sequenz zweimal die gleiche Base hintereinander, wird auch zweimal hintereinander das gleiche Nukleotid inkorporiert. Da beides Mal ein PPI entsteht, wird doppelt so viel Licht gemessen und im Pyrogramm als ein doppelt so hoher Ausschlag dargestellt.
- (5) Die Apyrase verdaut ATP und Nukleotide, die nicht eingebaut wurden. Das nächste Nukleotid darf erst nach einer vollständigen Degradierung dispensiert werden, wenn sich der Ansatz wieder im Ausgangszustand befindet. Der komplementäre Strang wird zunehmend aufgebaut und die Nukleotidsequenz kann anhand der Peaks im Pyrogramm abgelesen werden. Es muss beachtet werden, dass als Nukleotid nicht das natürliche Didesoxyadenosintriphosphat (dATP), sondern das Desoxyadenosin-alpha-thiotriphosphat (dATP α S) zugegeben werden darf, damit es von der Luciferase nicht fälschlicherweise als Substrat erkannt und umgesetzt wird, sondern von der DNA-Polymerase in die DNA integriert wird [215].

Für Methylierungsanalysen erhält man nach der Sequenzierung ein Protokoll, Pyrogramm genannt, das von der PyroMark Q-CpG 1.0.9 Software (Qiagen, Hilden, Deutschland) erstellt wird. Über eine farbliche Einteilung werden verschiedene Qualitätsstufen unterschieden. Blau entspricht der höchsten Qualität, rote Proben dürfen nicht ausgewertet werden und müssen wiederholt werden. Gelbe Proben wiesen eine mittelmäßige, jedoch auswertbare Qualität auf. Für Genotypisierungsanalysen wird das Protokoll mit der PyroMark MD (Qiagen, Hilden, Deutschland) generiert. Die Darstellung der Ergebnisse unterscheidet sich, aber der Farbcode entspricht dem der Methylierungsanalyse. Variable Positionen wie CpGs oder SNPs werden in der Referenzsequenz entsprechend vermerkt, z.B. Y = C oder T für CpG-Stellen. Im Sequenziervorgang werden an solchen Stellen nacheinander beide Nukleotide dispensiert. Anhand der Peakhöhen der beiden alternativen Nukleotide kann daraus eine Ratio berechnet werden, die sich relativ zu der Gesamtanzahl der vorhandenen DNA-Moleküle verhält und damit einen Mittelwert über die Methylierung dieser CpG Stelle angibt. Für eine Hemimethylierung, wie sie bei geprägten Genen vorkommt, würde man einen Methylierungsgrad von ungefähr 50 % erwarten. Ein vollständig methyliertes Gen zeigt

an die 100 % an, ein unmethyliertes Gen 0 %. Bei Genotypisierungen ist entsprechend die SNP-Ratio beider alternativen Basen gemeint. Darüber hinaus wird auch für jede Probe eine Durchschnittsmethylierung über alle sequenzierten CpGs berechnet.

Die Vorbereitung der Reaktionsansätze für die Pyrosequenzierung erfolgte mit dem PyroGold Q96 CDT Reagent Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) und Streptavidin Sepharose High Performance Beads (GE Healthcare BioScience, Uppsala, Schweden). Die Sequenzierung selbst wurde mit dem PyroMark Q96 MD (Qiagen, Hilden, Deutschland) abgehalten. Für die Probenpräparierung von Genotypisierungen und Methylierungsanalysen wurde ein identisches Standardprotokoll verwendet, was im Folgenden kurz erklärt wird:

- (1) Die Küvetten wurden in die Kartusche eingesetzt und die benötigte Menge an Nukleotiden eingefüllt. Die vom PyroMark MD bzw. PyroMark O-CpG Programm berechneten Mengen (abhängig von Assay und Probenzahl) wurden dabei mit 1,5 multipliziert. Der Enzym- und Substratmix wurde angesetzt und ebenfalls in die Küvetten gegeben. Mit dem Dispensierungstest wurde überprüft, ob die Küvetten richtig dispensieren.
- (2) In die PyroMark O96 HS Pyrosequenzierungsplatte wurden 11,5 µl Annealing-Puffer und 0,5 µl des jeweiligen Sequenzierungsprimers pro Probe pipettiert, entsprechend der geplanten Anordnung der PCR-Produkte. Für die unterschiedlichen Assays wurde jeweils ein Mastermix vorbereitet.
- (3) Je PCR-Produkt wurden 10 µl in die 96-Well-Mikrotiterplatte transferiert (bei schwachen Banden auch größere Volumina und entsprechend weniger Reinstwasser). Zusammen mit dem Mastermix muss das Gesamtvolumen 80 µl (70 µl Mastermix plus 10 µl PCR-Produkt) betragen. Die Anordnung der Proben wurde im PyroMark Q-CpG bzw. PyroMark MD Programm hinterlegt.
- (4) Der Mastermix bestand aus 40 µl Binding-Puffer, 28 µl hochreinem Wasser und 2 µl Sepharose Beads pro Probe. Die Sepharose Beads wurden zuletzt zugegeben, da sie sich sonst absetzen. Nachdem der Mastermix auf die PCR-Produkte in der Mikrotiterplatte verteilt war, wurde die Platte mit einer selbstklebenden Folie abgedichtet. Dies geschah um Kreuzkontaminationen zu vermeiden und anschließend 5 min bei 1.400 rpm zu vortexen (Einstellung 4-5 auf dem VortexGenie). In diesem Schritt kommt es zur Streptavidin-Biotin Bindung der DNA-Produkte an die Sepharose Beads.

(5) Arbeitsschritte an der Waschstation:

- Der Vakuumkopf wurde einige Sekunden in destilliertem Wasser gewaschen.
- Nachdem die Folie von der Mikrotiterplatte vorsichtig entfernt war wurde der Vakuumkopf in die Flüssigkeit gehalten, bis diese vollständig aufgesogen war. Die Sepharose Beads mit der über Streptavidin-Biotin gebundenen DNA sind zu groß für die Poren und bleiben durch den Unterdruck an den Stiftmembranen haften.
- Der Kopf mit den Beads wurde nacheinander in 70 %igen Ethanol, Denaturierungslösung (0,2 M NaOH-Lösung) und Waschpuffer gehalten und die Flüssigkeit dazwischen immer gründlich, in kreisenden Bewegungen aus dem Schlauch ablaufen gelassen. Diese Schritte dienen der chemischen Denaturierung der DNA und der Entfernung des nichtbiotinylierten DNA-Stranges.
- Der Vakuumkopf wurde genau über der 96-Well-Pyrosequenzierungsplatte positioniert und in dem Moment, in dem das Vakuum ausgeschalten wurde, abgesetzt. Die Beads mit dem einzelsträngigen biotinylierten DNA-Template wurden durch sanftes Rütteln in den Annealing Buffer samt den Pyrosequenzierungsprimern überführt.

(6) Für die finale Denaturierung wurde die Pyrosequenzierungsplatte 2 min auf einem Heizblock bei 80 °C inkubiert. Während der folgenden zweiminütigen Abkühlphase bei Raumtemperatur (RT) hybridisieren die Sequenzierprimer an ihre Zielregionen. Die fertige Pyrosequenzierungsplatte wurde in den Sequenzierer eingesetzt und der Lauf gestartet.

2.2.6.3 DBS mit dem Roche GS Junior

Deep Bisulfite Sequencing (DBS) ermöglicht eine amplikonspezifische DNA-Methylierungsanalyse auf Einzelmolekülebene. Mit der Roche GS Junior Technologie können in einem Lauf zwei Gene mit je 29 Proben untersucht werden. Insgesamt sind dazu fünf Arbeitsschritte erforderlich, die in Abbildung 16 aufgeführt sind. Bei der Generierung des Amplikons werden zwei aufeinander folgende PCRs durchgeführt in denen das Barcoding mit den multiplex identifiers (MIDs) erfolgt. Die Library wird präpariert, indem das PCR-Produkt aus der zweiten PCR aufgereinigt, die Qualität überprüft und die DNA-Konzentration gemessen wird. Nach einem Verdünnungsschritt werden die Proben gepoolt und es folgt

eine Emulsions-PCR (emPCR), bei der einzelne DNA-Moleküle an spezifische Beads gebunden und klonal amplifiziert werden. Diejenigen Beads, an welche DNA gebunden hat, werden angereichert und in die Reaktionskammern der PicoTiterPlate (PTP) vereinzelt. Alle für die Sequenzierung erforderlichen Reagenzien liegen dort vor. Die Sequenzierung chemie basiert auf einer hochparallelen Pyrosequenzierungstechnologie. Nach dem Sequenzierungsvorgang werden die Daten am GS Junior mit der geräteigenen Software vorprozessiert und anschließend mit dem Amplifyer ausgewertet.

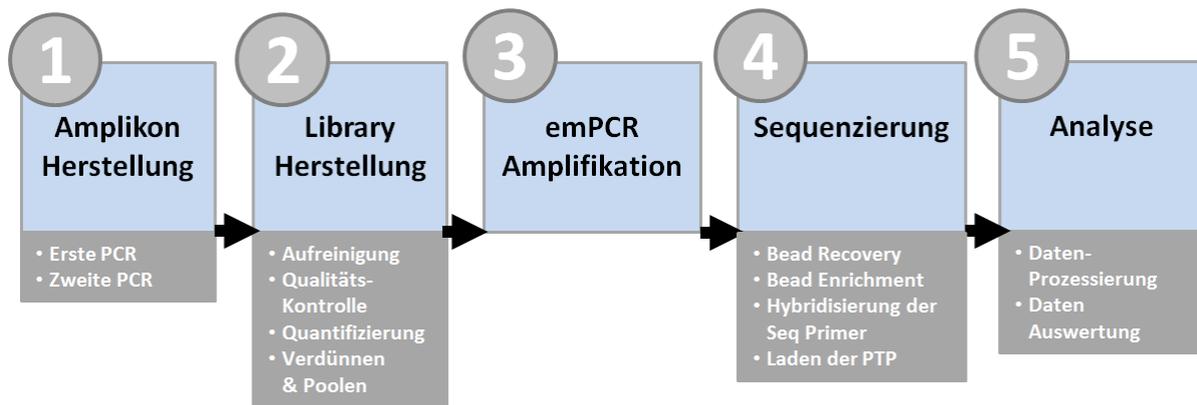


Abbildung 16: DBS Workflow mit der Roche GS Junior Technologie

emPCR: emulsion PCR; PTP: PicoTiterPlate.

2.2.6.3.1 Erste und Zweite PCR zur Amplicon-Generierung

In Abbildung 17 ist die Amplicon Herstellung mittels PCR schematisch erklärt. Für den in der Zielregion befindlichen informativen SNP wurde eine Genotypisierung vorgenommen um heterozygote Proben zu selektieren (siehe Tabelle 10 für die Genotypisierungsprimer und Tabelle 16 für die PCR-Bedingungen). Die Proben wurden danach bisulfitkonvertiert. Zur Generierung der DBS-Library sind zwei konsekutive PCRs erforderlich. Die erste PCR erfolgte mit lokus-spezifischen Primern, an die jeweils upstream Universal-Adapter ligiert waren (siehe Tabelle 11 für die ampliconspezifischen Primer). Für die zweite PCR wurde als Template das PCR-Produkt der ersten PCR eingesetzt. Dort wurden die Proben über 29 unterschiedliche MID-Primerpaare individuell markiert. Anhand des MIDs können die Reads auch nach dem Poolen den ursprünglichen Proben zugeordnet werden, da jede Probe mit einem anderen MID markiert wurde. Die MID-Sequenzen sind in Tabelle 12 aufgelistet. Über die komplementären Universal-Adapter-Sequenzen binden die Primer an das ampliconspezifische PCR-Produkt aus der ersten PCR. Deshalb sind die Primer der zweiten

PCR nicht genspezifisch, sondern universal einsetzbar für entsprechend markiertes PCR-Produkt. Neben den MID-Sequenzen enthalten die Primer auch die für die Sequenzierung essentiellen 454 Titanium-Sequenzen sowie einen Key-Abschnitt, der eine wichtige Rolle bei der Kalibrierung der Licht-Emission spielt. Die verwendeten PCR-Mastermixvolumina für einen Reaktionsansatz und die assayspezifischen PCR-Bedingungen für die erste PCR und die zweite PCR sind Tabelle 18 und Tabelle 21 zu entnehmen. Die erste PCR wurde in einem 25 µl Ansatz angesetzt, die zweite PCR in 50 µl. Die PCR-Bedingungen der zweiten PCR waren für beide Gene identisch. Dabei wurde im Programm das Primerannealing und die Elongation zu einem Schritt zusammengefasst (Schritt 4, Tabelle 18). Nach beiden PCRs wurde über ein 1,5 %iges Agarose Gel geprüft, ob die durchgeführte PCR erfolgreich war, die PCR-Produkte die erwarteten Größen aufwiesen und frei von Primerdimeren waren. Für *MEG3* IG-DMR betrug die Fragmentgröße nach der ersten PCR 347 bp, nach der zweiten PCR 417 bp und für *MEST* 331 bp und 401 bp. Da sich Primerdimere störend auf den weiteren Versuchsablauf auswirken, insbesondere bei der SPRI DNA-Bead-Aufreinigung, wurden die PCRs so lange optimiert, bis sie frei von Dimeren waren.

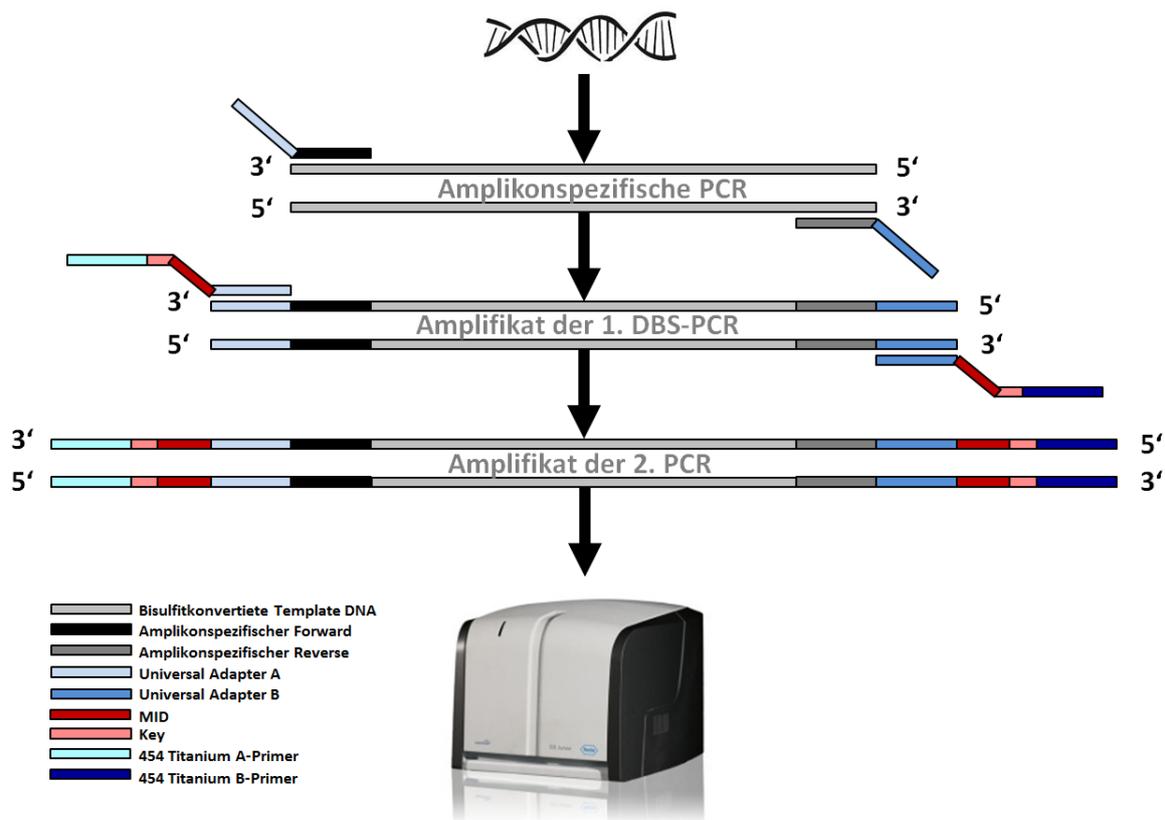


Abbildung 17: Prinzip zur Generierung einer DBS-Library mit der Roche GS Junior Technologie

MID: multiplex identifiers.

2.2.6.3.2 SPRI DNA-Bead-Aufreinigung

Nach der zweiten PCR folgte eine solid phase reversible immobilisation (SPRI) DNA-Aufreinigung mit den AMPure XP Beads (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland), um übrig gebliebene Nukleotide und Primer zu entfernen (siehe Abbildung 18). Für die Bead-Aufreinigung wurde das von Roche empfohlene Protokoll (Roche Amplicon Library Preparation Method Manual, GS Junior Titanium Series, March 2012) verwendet. Die AMPure XP Beads werden zu dem PCR-Produkt gegeben und binden an dieses (>150 bp). Nach einer Inkubationsphase werden die Reaktionsgefäße in einen Magnetic Particle Collector (MPC) (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) gestellt. Die Beads und damit auch die gebundenen DNA-Moleküle werden vom Magneten angezogen und sammeln sich als Pellet an der dem Magneten zugewandten Reaktionsgefäßwand. Andere Bestandteile des Reaktionsansatzes wie Nukleotide, Primer oder Salze bleiben in der Lösung und können als Überstand abgenommen werden. Mithilfe von 75 %igem Ethanol werden die zu sequenzierenden PCR-Produkte mehrfach gewaschen. Das Pellet mit den gebundenen DNA-Molekülen wird nach dem Reinigen bei RT getrocknet, um das Ethanol verdampfen zu lassen. Die Zugabe von Elutionspuffer führt zur Resuspension der DNA in den Puffer. Die Beads können magnetisch vom aufgereinigten PCR-Produkt separiert werden, welches in ein neues Reaktionsgefäß überführt wird.

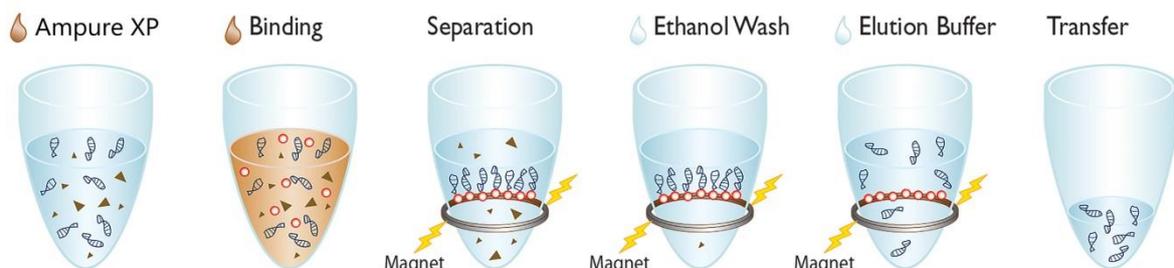


Abbildung 18: SPRI Aufreinigungsschemie für DNA

Abbildung übernommen von <http://www.labplan.ie/3page.asp?Menu=191&Page=701&SubPage=20>.
SPRI: solid phase reversible immobilisation.

2.2.6.3.3 Qualitätskontrolle, Quantifizierung und Pooling der Library zur Vorbereitung der emPCR

Um die Qualität der DBS-Library zu bestimmen, wurde eine Untergruppe von 12 Proben mit dem DNA 7500 LabChip auf dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn,

Deutschland) untersucht. Dazu wurden vor allem solche Proben herausgesucht, die im Gelbild die niedrigste Qualität aufwiesen. Mit dem Bioanalyzer können neben den gewünschten Produkten auch Kontaminationen mit Nebenprodukten oder Primerdimeren detektiert werden, da generell Fragmentlängen gemessen werden. Bei dem Einstellen der Chip Priming Station und dem Vorbereiten der Chips wurde sich an den „Agilent DNA 7500 and DNA 12000 Kit Quick Start Guide“ gehalten. Anschließend wurde die DNA-Konzentration mit dem NanoDrop 2000c Spectrophotometer (VWR, Darmstadt, Deutschland) quantifiziert. Basierend auf dieser Messung wurden alle Proben für ein Gen äquimolar zu je 400 ng pro Amplikon gepoolt. Die Pools für ein Gen wurden erneut mit den AMPure XP Magnetbeads aufgereinigt und mit dem NanoDrop 2000c zweimal zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen, woraus der Mittelwert berechnet wurde.

Die Anzahl an Molekülen je μl Library wurde folgendermaßen ermittelt:

$$\frac{\text{Moleküle}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{Probenkonzentration} \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right] * 6,022 * 10^{23}}{656,6 * 10^9 * \text{Amplikonlänge [bp]}}$$

Für jedes zu sequenzierende Gen wurden nun Amplikonpools mit derselben Konzentration ($1 * 10^9$ Moleküle/ μl) hergestellt. Um die Amplikonpools zu verdünnen wurde 1 x TE zugegeben. Das dazu benötigte Volumen wurde mit dieser Formel berechnet.

$$\frac{\text{Moleküle}/\mu\text{l}}{10^9} - 1$$

Für den finalen Pool, der dann auch später in die emPCR eingesetzt wurde, wurden jeweils 10 μl der äquimolaren Amplikonpools vereint und mit hochreinem Wasser auf eine Konzentration von $1 * 10^6$ Moleküle verdünnt.

2.2.6.3.4 Emulsions-PCR zur klonalen Amplifizierung

Die Emulsions-PCR (emPCR) ist essentiell für die eigentliche DBS Sequenzierung und findet in einer Öl-Wasser-Emulsion statt. Dabei bindet ein einziges DNA-Molekül an ein Capture Bead und wird umgeben von einem Öl-Tropfen klonal amplifiziert, sodass nach der PCR viele tausend Kopien desselben Ausgangsmoleküls am Bead hängen. Dieser Prozess wird in Abbildung 19 veranschaulicht. Die Bindung der DNA-Moleküle an die Capture Beads erfolgt

über die 454 Titanium A- bzw. B-Primer zu denen komplementäre Bindungssequenzen an der Bead-Oberfläche angebracht sind.

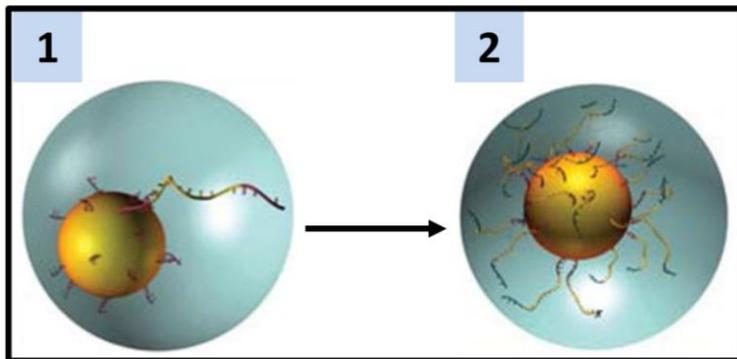


Abbildung 19: Klonale Amplifizierung mittels emPCR

Abbildung übernommen von <http://www.nature.com/nmeth/journal/v5/n9/images/nmeth.f.220-F2.jpg> und modifiziert.

Die emPCR wurde mit dem GS Junior Titanium emPCR Kit (Lib-A) (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) nach dem dazugehörigen Protokoll „emPCR Amplification Method Manual-Lib-A“ angesetzt. Um das erforderliche Volumen an finaler DNA Library für die emPCR zu kalkulieren, wurde folgende Berechnung durchgeführt. Da mit bisulfitkonvertierter DNA gearbeitet wurde, deren Fragmentierungs- und Degradierungsgrad deutlich höher ist als der unkonvertierter DNA, wurde die gewünschte Molekülzahl pro Bead von 1 auf 1,5 hochgesetzt und die doppelte Menge an finaler DNA Library (also insgesamt 15 µl), eingesetzt.

$$\text{Finale DNA Library } [\mu\text{l}] = \frac{\text{Gewünschte Molekülzahl pro Bead} * 5 \text{ Millionen Beads}}{\text{Library Konzentration } \left(\frac{\text{Moleküle}}{\mu\text{l}}\right)} * 2$$

Nach der emPCR wurde die Emulsion durch einige Waschschrte durchbrochen und die Beads aus den Öl-Tropfen zurückgewonnen. Diejenigen Beads, an denen die klonale Amplifikation geglückt ist und die deshalb PCR-Produkte auf ihrer Oberfläche trugen, wurden von solchen getrennt, an die keine DNA gebunden hatte. Dies wurde über eine Anreicherung mit magnetischen Enrichment Beads gewährleistet. Dazu binden Enrichment Primer an die PCR-Produkte auf den Capture Beads und diese wiederum an die komplementären Sequenzen auf den Enrichment Beads. Im MPC bildet sich ein Pellet aus Enrichment Beads und „Doppelbeads“ mit den gebundenen Capture Beads. Ungebundene Capture Beads ohne

entsprechende DNA-Fragmente fielen aus und wurden durch mehrmaliges Waschen entfernt. Im letzten Schritt wurden die nun angereicherten Enrichment Beads über einen Denaturierungsprozess wieder von den Capture Beads gelöst.

2.2.6.3.5 Sequenzierung und Datenanalyse

Für die Sequenzierung war das GS Junior Titanium Oil and Breaking Kit, das GS Junior Titanium Sequencing Kit und das GS Junior Titanium PicoTiterPlate (PTP) Kit (alle Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) sowie das entsprechende Protokoll (Sequencing Method Manual) notwendig. Zu den selektierten DNA-tragenden Capture Beads wurden die Sequenzierungs-Primer gegeben und die Beads in eine PicoTiterPlate (PTP) geladen, sodass nur ein einzelnes Bead in eines der vielen hundert Wells transferiert wurde. Der Beladungsvorgang ist in Abbildung 20 dargestellt. Beim Beladen wurde ein Bead Deposition Device (BDD) zu Hilfe genommen und nacheinander 4 Schichten an Beads aufgetragen. Zuerst eine Enzym Bead Prä-Schicht, als Zweites Verpackungs-Beads kombiniert mit den DNA-tragenden Capture Beads, dann eine Post-Schicht aus Enzym Beads und zuletzt eine Schicht aus PPIase Beads. Die Sequenzierung wurde mit dem Roche 454 GS Junior durchgeführt (Setting: 200 Zyklen, run group application II, full processing for amplicons). Die Sequenzierung erfolgt nach dem Pyrosequenzierungsprinzip, allerdings wird kein genspezifischer Assay abgearbeitet. Die vier Nukleotide werden sequentiell dispensiert und ein Einbau resultiert in einem Lichtsignal, das von der CCD Kamera erkannt und aufgezeichnet wird. Da die PTP in einem Wellformat aufgebaut ist, mit idealerweise nur einem einzigen Bead pro Well und den während der emPCR generierten klonalen Kopien eines Ursprungsallels, können die Signale lokal exakt zugeordnet werden und ergeben die finale Sequenz und Methylierung. Nach dem Run werden von der geräteeigenen Software solche Sequenzen entfernt, die entweder eine schlechte Qualität aufwiesen oder bei denen vermutet werden kann, dass sich mehr als ein einzelnes Bead in einem Well befand. Es werden auch solche Sequenzen eliminiert, bei denen mehr als ein Ausgangs-DNA-Molekül an ein Bead gebunden hatte und amplifiziert wurde [217, 218]. Mit der Amplifyer Software wurden Standard Flowgram Files (SFF) analysiert [219]. Dabei wurden die Reads zuerst gegen Referenzsequenzen der Zielgene aligniert (Locigenomic-Files), um zwischen den beiden gepoolten Genen unterscheiden zu können und dann anhand der individuellen MIDs

den Proben zugeordnet. Es wurde eine „bad CpG rate“ von 10 % der zu analysierenden CpG-Stellen zugelassen, was 2 für *MEST* (22 CpGs) und 0 für *MEG3* IG-DMR (5 CpGs) entsprach. Mit dem Amplifyzer kann die CpG Methylierung sowohl über eine Probe, ein Read als auch individuell pro CpG-Stelle untersucht werden. Um die parentale Allel-Herkunft unterscheiden zu können, wurde der genotypisierte SNP im Locigenomic File mit „N“ gekennzeichnet und zweimal mit den beiden alternativen Basen als „wildcard“-Setting in der Methylierungs-Karteikarte gefiltert. Für bisulfitkonvertierte DNA existiert ein von Roche bereitgestellter Filter mit dem Namen „bisRecommendationFilter“. Dieser lässt auch Reads zu, die normalerweise nicht den Qualitätsansprüchen gerecht würden, weil die Filterkriterien weniger streng sind. Unter Verwendung dieses Filters traten an der SNP Position vereinzelt auch Reads für Basen auf, die nicht den beiden SNP-Alternativen entsprachen und damit sichere Sequenzierungsartefakte waren. Aus diesem Grund wurde bei der Auswertung auf den „bisRecommendationFilter“ verzichtet.

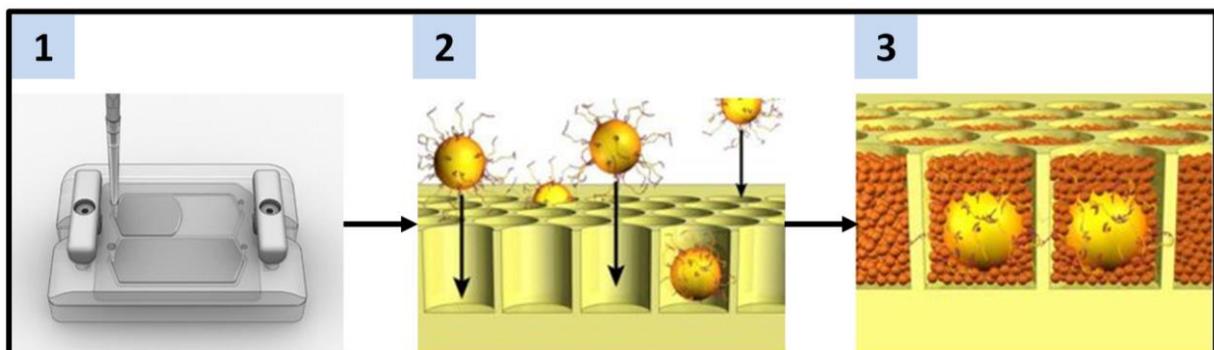


Abbildung 20: Beladen der PicoTiterPlate (PTP) mit DNA-tragenden Capture Beads

Abbildung übernommen von http://images.slideplayer.com/20/5978508/slides/slide_6.jpg und modifiziert.

2.2.6.4 DBS mit dem Illumina MiSeq

In einem MiSeq Lauf wurden parallel bis zu 12 Gene à 24 Proben untersucht. Der dazu nötige Arbeitsablauf lässt sich in 6 Unterschritten gliedern, die in Abbildung 21 aufgezählt werden. Über assayspezifische PCRs wurden im ersten Schritt die Amplikons generiert. Vor dem Verdünnen und Poolen der Amplikons zu der Library wurden die Amplikons aufgereinigt und quantifiziert. Dann folgte die Ligation der Adapter mit vorangestelltem A Tailing, einer USER-Enzym Behandlung und einer erneuten Aufreinigung. Über eine Ligationseffizienz PCR wurde die optimale Zyklenzahl für die finale Amplifikation bestimmt. Um die Library danach auf die

folgende Sequenzierung vorzubereiten, wurde sie abermals aufgereinigt, die Qualität überprüft und nach einem Quantifizierungsschritt verdünnt und final gepoolt.

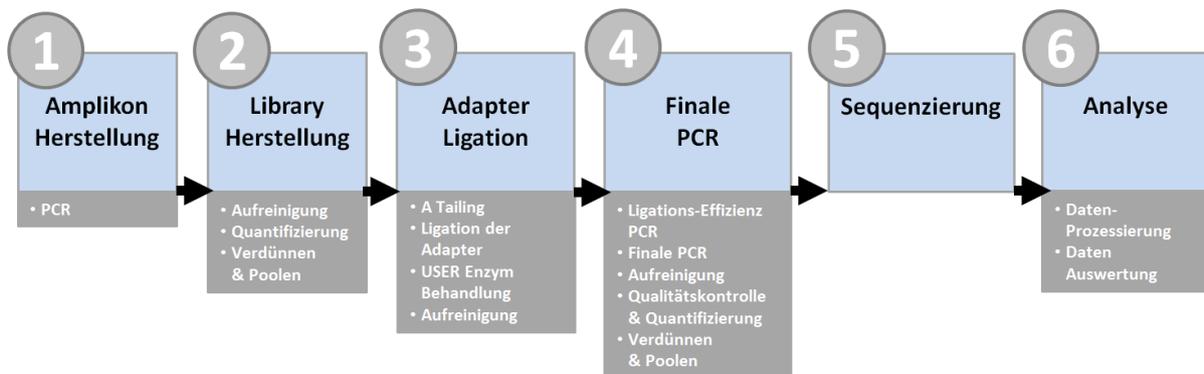


Abbildung 21: DBS Workflow mit der Illumina MiSeq Technologie

2.2.6.4.1 PCR zur Amplicon-Generierung

Abbildung 22 zeigt das schematische Prinzip der Amplicon Herstellung mittels PCR und der Library Präparation. Mit den bisulfitkonvertierten und genotypisierten Proben wurde eine lokus-spezifische PCR durchgeführt um die Zielregion zu amplifizieren. Die Reaktion wurde für ein Reaktionsvolumen von 50 μ l angesetzt und als Template 2 μ l DNA eingesetzt (PCR Bedingungen siehe Tabelle 19 und PCR-Mastermix siehe Tabelle 22). Über ein 1,5%iges Agarose Gel wurde die Fragmentgröße der PCR-Produkte kontrolliert. Die untersuchten Amplicons für *MEG3* IG-DMR, *MEG3* Promotor, *MEST* und *PEG3* waren 398 bp, 390 bp, 476 bp und 408 bp lang (Tabelle 13).

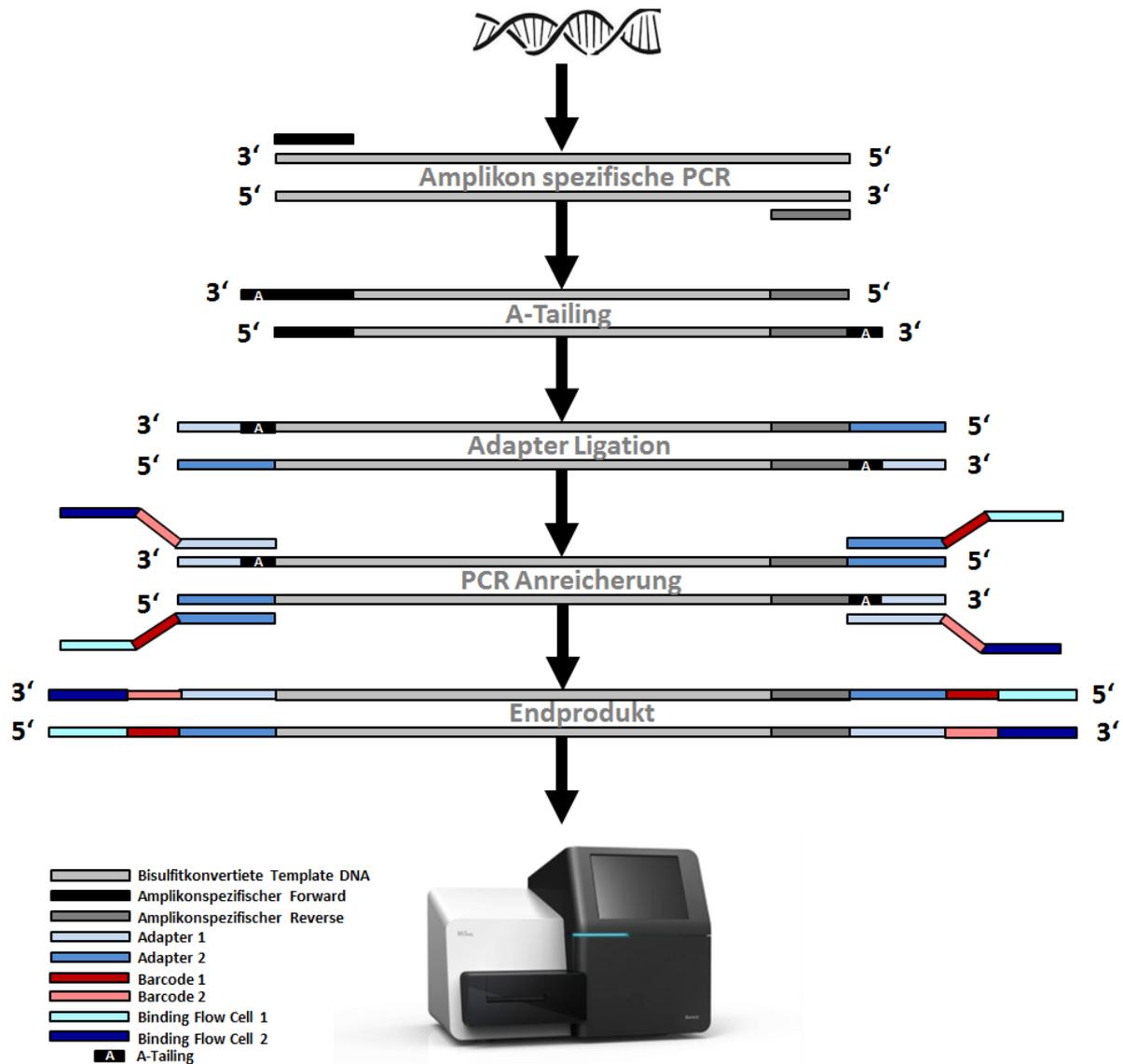


Abbildung 22: Prinzip zur Generierung einer DBS-Library mit der Illumina MiSeq Technologie

2.2.6.4.2 Library Präparation und Adapter Ligation

Nach der Generierung der Amplikons über PCRs wurden die PCR-Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt (http://2012.igem.org/wiki/images/a/a3/QIAquick_PCR-purification.pdf). Dabei wurden 2 µl NaAc (pH 5) verwendet und in 30 µl Elutionspuffer eluiert. Die DNA-Konzentration der Proben wurde mit dem Qubit dsDNA BR Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) gemessen. Dafür wurde der User Guide „Qubit dsDNA BR Assay Kits“ (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit_dsDNA_BR_Assay_UG.pdf) herangezogen und wie in Abbildung 14 beschrieben vorgegangen. In Abhängigkeit der Assay-

Anzahl wurden die PCR-Produkte mit Wasser auf 0,2 ng/µl verdünnt und anschließend pro Indexkombination gepoolt (3 µl je Probe). Insgesamt wurden auf diese Weise 24 Index-Pools hergestellt. Die Pools wurden mit den AMPure XP Beads (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland) über die SPRI-Chemie aufgereinigt (siehe Abbildung 18). Das verwendete Verhältnis von DNA-Pool zu Beads betrug 1:0,6 und das Elutionsvolumen war 12,5 µl. Das Ziel der Aufreinigung ist die Eliminierung von Primern und Nukleotiden vor der Adapter Ligation. Mit Hilfe des A Tailings wird enzymatisch ein nicht-Template Adenin an das 3' Ende eines glatten (englisch: blunt) Endes eines DNA Moleküls angehängt. Der Mastermix sowie die Cycler-Protokolle für die Enzyminkubation (A) und die Enzyminaktivierung (B) sind in Tabelle 25 aufgeführt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass der Cyclerdeckel für die Inkubation (A) nicht vorgeheizt wird. Das Klenow-Fragment ist eine N-terminale Trunkierung der Polymerase I und besitzt als solche eine Polymeraseaktivität. Die Exonuklease-Aktivitäten in 5'-3' und 3'-5' Richtung ist allerdings verloren gegangen [220]. Es wird aus *E. coli* gewonnen und wurde erstmals im Jahre 1970 beschrieben [221].

Tabelle 25: A Tailing Mastermix und Temperaturen der Enzyminkubation und Enzyminaktivierung

A) & B) Reagenz (Konzentration)	Volumen für einen 1x Ansatz [20 µl]	A) Enzyminkubation	
		Temperatur	Dauer
DNA-Pool (~ 1 ng)	5 µl	ohne vorgeheizten Deckel 30 °C	20 min
NEB Puffer (10 x)	2 µl	37 °C	20 min
dATP (1 mM)	1 µl	4 °C	∞
Klenow Fragment (3'→5' Exo) (5 U)	0,3 µl	B) Enzyminaktivierung	
		Temperatur	Dauer
H ₂ O	11,7 µl	mit geheiztem Deckel 75 °C	20 min

Nach dem A Tailing muss unverzüglich die Ligrationsreaktion angeschlossen werden, da die angehängten Adenine wieder abfallen können, wenn die Proben eingefroren oder lange bei 4 °C gelagert werden. Für die Adapter Ligation wurde das NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Dual Index Primers Set 1) Kit und die T4 DNA Ligase (beides New England Biolabs, Ipswich, USA) verwendet. Die NEBNext Adapter haben eine Loopform und werden an die A getailten PCR Produkte angehängt. Durch die Behandlung mit dem Uracil-Specific Excision Reagent (USER)-Enzym werden die Loops nachträglich an der Uracilposition aufgespalten, sodass die beiden Adapter (grün und gelb) frei zugänglich vorliegen (siehe Abbildung 23).

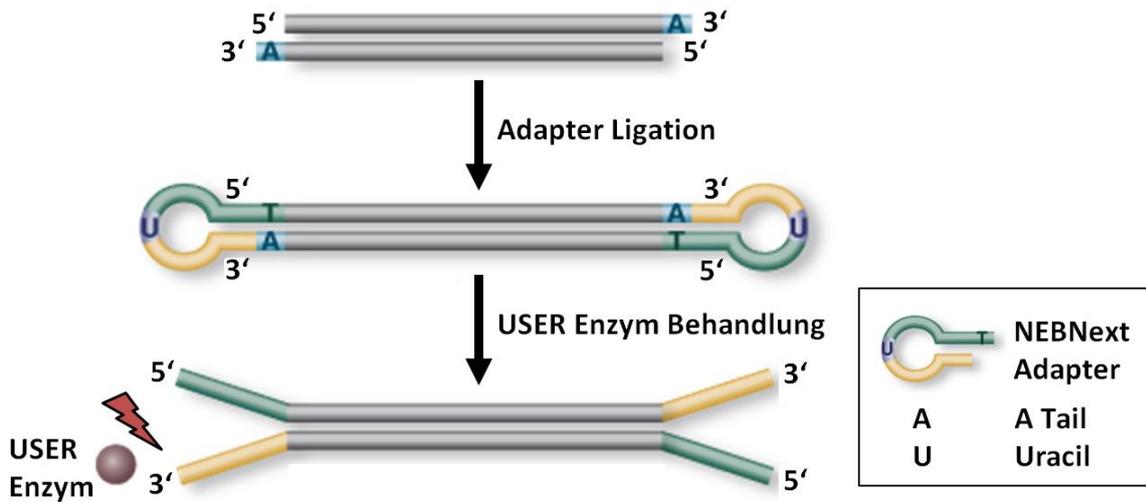


Abbildung 23: NEB Dual Index Workflow for Illumina

Abbildung übernommen von <https://www.neb.com/products/e7600-nebnext-multiplex-oligos-for-illumina-dual-index-primers-set-1> und modifiziert.

Bevor man mit der Inkubation beginnt, muss der Cycler auf 16 °C vorgekühlt werden (Deckelheizfunktion ausgeschaltet). Die Enzyminkubation der Pools erfolgt 16 - 20 Stunden. Im Anschluss erfolgt die Enzyminaktivierung beginnend mit einer 10 minütigen Hitzeinkubation. Es werden je 3 µl des USER-Enzyms zu den 30 µl Reaktionsvolumen für jede Probe gegeben und weitere 15 min bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 26: Adapter Ligation und USER-Enzym Behandlung: Enzyminkubation und Inaktivierung

A) Reagenz (Konzentration)	Volumen für einen 1x Ansatz [30 µl]	A) Enzyminkubation	
		Temperatur	Dauer
DNA-Pool nach dem A Tailing	20 µl	ohne vorgeheizten Deckel 16 °C	über Nacht (16-20 h)
T4 DNA Ligase Puffer (10 x)	3 µl	B) Enzyminaktivierung	
T4 DNA Ligase (400 U) auf Eis auftauen	0,5 µl	Temperatur	Dauer
Adapter (15 µM)	0,5 µl	65 °C	10 min
H ₂ O	6 µl	3 µl USER-Enzym zu den 30 µl Reaktionsansätzen geben	
		37 °C	15 min

Nach der Ligation der Adapter und vor der finalen PCR müssen die Pools nochmals über die SPRI Bead Aufreinigung von den Enzymresten und den ungebundenen Adaptern befreit werden. Das DNA-Proben zu Bead Verhältnis betrug dafür 1:0,95. Es wurde in 20 µl Elution Buffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) eluiert.

2.2.6.4.3 Zweite PCR und Sequenzierung

Mithilfe der Ligationseffizienz-PCR wurde die optimale Zyklenzahl für die finale (zweite) PCR ermittelt. Dazu wurde der Reaktionsansatz für 50 µl angesetzt (inklusive DNA-Probe und einer Index-Primerkombination von Tabelle 14) und auf 4 Reaktionsgefäße zu je 10 µl aufgeteilt, die dann mit variierender Zyklenzahl amplifiziert wurden. Die Zusammensetzung des Mastermix und das genaue Cyclerprogramm sind Tabelle 27 zu entnehmen. In einem 1,5 %igen Agarose-Gel wurden die vier Ansätze anhand der Bandenstärken miteinander verglichen. Für die Ligationseffizienz-PCR wurde das Fast Start Taq DNA Polymerase System (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) verwendet. Für die finale PCR dagegen die PfuTurbo C_x Hotstart DNA Polymerase (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland), die eine Proofreading Funktion aufweist (siehe Tabelle 28). Die Ligationseffizienz-PCR und die zweite PCR werden in Kapitel 2.2.3 (Polymerasekettenreaktion) detaillierter beschrieben.

Tabelle 27: Ligationseffizienz-PCR: Mastermix und Cyclerprogramm

Mastermix		Cyclerprogramm			
Reagenz (Konzentration)	Volumen für einen 1x Ansatz [50 µl]	PCR Schritt	Funktion	Temp.	Dauer
10x PCR-Puffer mit MgCl ₂	5,0 µl	1	Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
PCR Grade Nucleotide Mix (jede Base 10 mM)	0,5 µl	2	Denaturierung	95 °C	30 s
Forward Index Primer (10 µM) (i501-i508)	1,0 µl	3	Primer-Annealing	65 °C	30 s
Reverse Index Primer (10 µM) (i701-i712)	1,0 µl	4	Elongation	72 °C	45 s
FastStart Taq DNA Polymerase (5U/µl)	1,0 µl	5	Finale Elongation	72 °C	7 min
DNA-Pool nach der Adapter Ligation	3,0 µl	6	Lagerung	8 °C	∞
H ₂ O	Ad 50 µl	Die Zyklen 2-4 wurden in individuellen Ansätze 16x, 18x, 20x und 22x wiederholt			

Tabelle 28: Zweite PCR: Mastermix und Cyclerprogramm

Mastermix		Cyclerprogramm			
Reagenz (Konzentration)	Volumen für einen 1x Ansatz [50 µl]	PCR Schritt	Funktion	Temp.	Dauer
10x Pfu Turbo C _x Polymerase Puffer	5,0 µl	1	Initiale Denaturierung	92 °C	2 min
PCR Grade Nucleotide Mix	0,5 µl	2	Denaturierung	92 °C	30 s

(jede Base 10 mM)					
Forward Primer (10 μ M) (i501-i508)	1,0 μ l	3	Primer-Annealing	65 °C	30 s
Reverse Primer (10 μ M) (i701-i712)	1,0 μ l	4	Elongation	68 °C	45 s
PfuTurbo C _x Hotstart DNA Polymerase (2,5 U/ μ l)	1,0 μ l	5	Finale Elongation	68 °C	7 min
DNA-Pool nach der Adapter Ligation	3,0 μ l	6	Lagerung	8 °C	∞
H ₂ O	Ad 50 μ l	In der Ligationseffizienz-PCR wurde die optimale Zyklenzahl für die Schritte 2-4 ermittelt			

Innerhalb der zweiten PCR wurden die Pools über die Indices (vergleiche Tabelle 14 und Abbildung 22) für die Sequenzierung gebarcodet und mit den Bindesequenzen für die Flow Cell ausgestattet. Die Pools wurden noch zwei weitere Male mit der SPRI Bead Methode aufgereinigt (DNA-Pools:Beads \rightarrow 1:0,9), dabei wurde beim ersten Mal in 40 μ l Elutionspuffer und beim zweiten Mal in 25 μ l Elutionspuffer eluiert. Die DNA-Konzentration und die Fragmentlänge der Pools wurde mit dem High Sensitivity DNA Kit auf dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) gemessen. Dabei wurde wie im „Agilent High Sensitivity DNA Kit Quick Start Guide“ beschrieben vorgegangen. Die 24 Index-Pools wurden mit Elutionspuffer auf 4 nM verdünnt und je 3 μ l zu einem finalen Pool kombiniert. Die fertige Library wurde erneut auf dem Bioanalyzer vermessen und wenn die Endkonzentration stimmte, mit dem MiSeq Reagent Kit v3 (2 x 300 Cycles) (Illumina, San Diego, USA) sequenziert. Für die Sequenzierung wurden der „MiSeq System Guide“ und der „Preparing Libraries for Sequencing on the MiSeq“ Guide herangezogen. Im „Illumina Experiment Manager“ wurde ein neues Sample Sheet mit den folgenden Einstellungen angelegt: TruSeq HT, Index Reads:2, Read Type: Paired End, Use Adapter Trimming: X, Cycle: 301. Die Sequenzen für die 24 Indexkombinationen wurden eingepflegt. Die vorbereitete 4 nM Library wurde mit 0,2 M NaOH 1:1 denaturiert, mit HT1 Puffer auf 12 pM verdünnt und mit einer 12 pM PhiX Control v3 (Illumina, San Diego, USA) in einem 5:1 Verhältnis balanciert. PhiX ist eine kommerziell angebotene Adapter-ligierte Kontrolle, die besonders wichtig ist für low-diversity Libraries, wie sie bei einer Amplikonsequenzierung mit bisulfitkonvertierter DNA vorliegen.

2.2.6.4.4 Datenanalyse

Die analysierten Läufe erreichten einen Q-Score von ungefähr 95 % und ein Cluster Passing Filter von über 85 %. Die Cluster Dichte lag zwischen 1000 - 1400 K/mm². Nach dem Demultiplexen wurde mit dem Programm FastQC Version 0.11.2 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) eine erste Einschätzung der Qualität der Sequenzierungsdaten vorgenommen. Die Eliminierung von Reads mit unzureichender Qualität und das Trimmen der Adapter wurde mit Cutadapt Version 1.6 (<https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/>) [222] und TrimGalore Version 0.4.0 (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/) gemacht. Das anschließende Joining erfolgte mit fastq-join von ea-utils Version 1.1.2-537 (<https://expressionanalysis.github.io/ea-utils/>) und das Referenz-Alignment mit Bismark Version 0.14.3 [223] (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/bismark/>) und Bowtie2 Version 2.2.6 [224] (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>). Eine Visualisierung der Daten auf Einzelmolekülebene wurde durch den Integrative Genomics Viewer (IGV) [225, 226] (<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>) und GenSearchNGS Version 4.4 (<http://www.phenosystems.com/www/index.php/products/gensearchngs>) gewährleistet. Die Heatmaps wurden erstellt mit der heatmap.2 function des gplots R package (Setting: Cluster: complete, Distanz: euclidian). Eine Auflistung aller DBS Methylierungswerte, der daraus berechneten Epimutationsraten sowie korrespondierende Expressionsdaten sind dem Anhang zu entnehmen (Tabelle 48).

3 Ergebnisse

3.1 Genomweite Methylierungsstudie mit dem Illumina Infinium HumanMethylation 450 K Array und anschließender Pyrosequenzierungs-Validierung

Um neue Gene zu finden, die mit fetaler Programmierung assoziiert sind und eine Rolle bei Gestationsdiabetes (GDM) spielen, wurde ein genomweites Methylierungsscreening mit Illumina Infinium HumanMethylation 450K Arrays durchgeführt (NCBI GEO Accession Nr. GSE88929), bei dem Nabelschnurblute von GDM-Schwangerschaften mit denen unauffälliger Schwangerschaften (Kontrollen) verglichen wurden. In Abgrenzung zu anderen GDM-Studien wurde hierbei großen Wert auf die Behandlungsweise gelegt und zwischen Insulin behandeltem GDM (I-GDM) und diätisch behandeltem GDM (D-GDM) unterschieden. Einige der dabei gefundenen Kandidaten-Gene wurden anschließend mittels Pyrosequenzierung in einer größeren (teilweise unabhängigen) Probenkohorte untersucht. Die Validierung wurde durchgeführt, um die Verlässlichkeit der Array-Studie sowie die Richtigkeit der gefunden Effekte mit einer zweiten Methode zu bestätigen. Alle Ergebnisse (mit Ausnahme der *ADAP1*-Untersuchung) sind in der Publikation „Epigenetic signatures of gestational diabetes mellitus on cord blood methylation“ veröffentlicht, die 2017 in *Clinical Epigenetics* erschienen ist [18]. Die statistischen und bioinformatischen Auswertungen der Microarrays und Pyrosequenzierungen wurden in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Bioinformatik Würzburg durchgeführt und publiziert.

3.1.1 Workflow der Studie, Umfang und klinische Parameter der Untersuchungskohorten

Der Arbeitsablauf begann mit der DNA-Isolation aus FCB und einer anschließenden obligatorischen Bisulfitkonvertierung der Proben, gefolgt von zwei zeitlich voneinander unabhängigen Array-Experimenten (Datensatz A und B). Es folgte eine umfangreiche bioinformatische Auswertung resultierend in einer Metaanalyse über beide Datensätze hinweg und Validierungs-Experimenten einiger gefundener Kandidaten-Gene mit Hilfe von Pyrosequenzierungen der Array-CpGs (und weiterer benachbarter CpGs im Gen-Locus). Der Workflow ist in Abbildung 24 dargestellt.

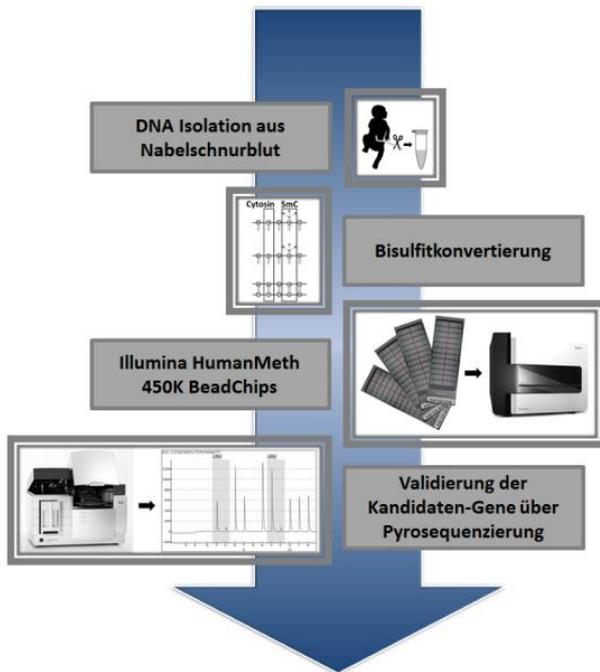


Abbildung 24: Ablauf der GDM-Array Studie mit Pyrosequenzierungsvalidierung

Die beiden Array-Experimente wurden nacheinander in einem zeitlichen Abstand von circa zwei Jahren durchgeführt. Die Präparation der Proben und die Durchführung der Sequenzierung unterschieden sich dabei jedoch nicht. Der Datensatz A umfasste insgesamt 38 Proben (hybridisiert auf vier Arrays), wobei zwischen 20 I-GDM Proben und 18 Kontrollen unterschieden wurde. Der Datensatz B bestand aus insgesamt 94 Proben à acht Arrays, zusammengesetzt aus 24 I-GDM Proben, 24 D-GDM Proben und 46 Kontrollen. Insgesamt wurden demnach 132 Proben mit den Microarrays untersucht. Über eine versuchsübergreifende statistische Metaanalyse wurden solche CpGs selektiert, die in beiden Datensätzen einen Gruppenunterschied in die gleiche Richtung aufwiesen. Für vier genassoziierte signifikante CpGs aus dieser Auswertung (*ATP5A1*, *PRKCH*, *MFAP4* und *SLC17A4*), und ein Kandidaten-Gen aus der Literatur (*HIF3A*) wurden Validierungsassays für die Pyrosequenzierung designt. Die Validierungskohorte umfasste insgesamt 181 Proben bestehend aus 56 Kontrollen, 61 I-GDM und 64 D-GDM Proben.

Alle verfügbaren klinischen Parameter der analysierten Untersuchungskohorten (Array-Kohorte A, Array-Kohorte B und Pyrosequenzierungs-Kohorte) sind Tabelle 1 und Tabelle 2 zu entnehmen. Mit über 90% war die überwiegende Mehrheit der an der Studie teilnehmenden Familien mitteleuropäischer (kaukasischer) Abstammung. Einige wenige Familien hatten auch russische, türkische oder südosteuropäische Wurzeln. Die meisten der

aufgeführten mütterlichen als auch kindlichen Parameter befanden sich in den erwarteten Normbereichen und zeigten keine bemerkenswerten signifikanten Gruppenunterschiede. Auf eine gleichmäßige Verteilung des kindlichen Geschlechtes über alle Untersuchungsgruppen hinweg wurde geachtet. Wenn Vorerkrankungen der Mütter bekannt waren, die sich auf die Schwangerschaft oder die Geburt auswirken könnten (z.B. Bluthochdruck oder Schilddrüsenfehlfunktionen) wurden diese explizit angegeben, ebenso wie die Frühgeburtenrate (< 37. SSW) und die Kindesgröße im Verhältnis zum Gestationsalter mit *small for gestational age* (SGA, < 10% Perzentile), *appropriate for gestational age* (AGA, 10% - 90% Perzentile) bzw. *large for gestational age* (LGA, > 90% Perzentile). Im Array-Experiment A war das Geburtsgewicht der Kinder in der I-GDM Gruppe mit $p = 0,016$ signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen (siehe Tabelle 1), einhergehend mit einem ebenfalls (aber nicht signifikant) höheren mütterlichen BMI und erhöhtem Plazentagewicht in der I-GDM Gruppe. Für Schwangerschaftsdiabetes ist diese Korrelation weitgehend bekannt und kann auch durch optimales Matchen nicht ganz unterbunden werden. Sie zeigt sich auch in der Array-Kohorte B mit einem in den GDM-Proben signifikant erhöhten mütterlichen Gewicht vor der Schwangerschaft ($p = 0,034$) bzw. vor der Geburt ($p = 0,009$) und einem daraus hervorgehenden signifikant erhöhten mütterlichen BMI mit $p = 0,018$. Das Geburtsgewicht der GDM-Kinder war ebenfalls leicht erhöht. Zum Plazentagewicht kann keine Aussage getroffen werden, da dies für die Kontrollgruppe (für höhere IDs nicht mehr notiert wurde und daher) nicht vorlag. Auch in der Pyrosequenzierungskohorte sind ähnliche Trends zu beobachten. Hier war ebenfalls das mütterliche Gewicht vor der Schwangerschaft und der Geburt, sowie der BMI (alle $p < 0,001$) in den GDM-Proben (besonders in der I-GDM-Kohorte) höher als in den Kontrollen, resultierend in einem ebenso höheren, wenn auch nicht signifikantem Geburtsgewicht der Kinder ($p = 0,051$). Generell lässt sich aus den klinischen Parametern ableiten, dass GDM-Mütter im Vergleich zu Non-GDM-Müttern ein höheres Gewicht und daraus resultierend ebenfalls einen höheren BMI haben. Die GDM-Kinder weisen ebenfalls ein höheres Geburts- und Plazentagewicht auf als Non-GDM-Kinder. Dadurch entstehender Platzmangel und andere mutmaßlich GDM-assoziierte Komplikationen während der Schwangerschaft, erklären dass das Gestationsalter der Kinder bei der Geburt (SSW) niedriger ist und proportional mehr Kinder per Kaiserschnitt (CS) als auf natürlichem Wege (UVB) geboren werden. Diese Beobachtungen sind konform mit der GDM-beschreibenden Fachliteratur und

können folglich in keinem GDM-Datensatz vollständig eliminiert, allenfalls nachträglich in statistischen Auswertungen als bekannte Störfaktoren berücksichtigt werden. Der GDM-Phänotyp ist dabei in den I-GDM-Fällen zumeist stärker ausgeprägt als in den D-GDM-Fällen, weshalb die nachfolgend beschriebenen Effekte dort stärker zu Tage treten. Es ist außerdem anzumerken, dass in Industrieländern ein diagnostizierter Gestationsdiabetes im Normalfall gewissenhaft behandelt wird. Die HbA1c Levels aller Untersuchungskohorten waren deshalb nicht niedriger als 5,5%, was auf einen gut eingestellten GDM rückschließen lässt.

3.1.2 Methylierungsarray-Screening

3.1.2.1 Globale Methylierung

Für den Datensatz A genügten insgesamt 452.932 CpGs den Qualitätsanforderungen, für den Datensatz B waren es 455.307 CpGs, was auf eine allgemein gute technische Qualität der Arrayexperimente schließen lässt. Der Vergleich der globalen Array-CpG Methylierung zwischen den Gruppen erfolgte mittels linearer Modelle [227] und zeigte keine signifikanten Unterschiede für die Array-Kohorte A (I-GDM vs. Kontrollen) mit $p = 0.87$ und Array-Kohorte B (I-GDM vs. D-GDM vs. Kontrollen) mit $p = 0.94$. Dabei wurde für die Kovariate kindliches Geschlecht (Prozessierungsbatch) korrigiert, da die Arrays nach den Geschlechtern getrennt an verschiedenen Tagen sequenziert werden mussten. Diese Aufteilung war aufgrund einer begrenzten Labor-Ausstattung technisch unumgänglich. Die Array-CpGs wurden in folgende Untergruppen gegliedert: CpG islands (CGIs), flankierende CGI shores (2 kb entfernt), CGI shelves (2 – 4 kb entfernt) und open sea (weiter als 4 kb entfernt, nicht CGI assoziiert). Die Bezeichnung „North“ steht für Regionen stromaufwärts, „South“ für Regionen stromabwärts der CGIs [228, 229]. Dabei fielen keine signifikanten Gruppenunterschiede auf (p -Werte zwischen 0,12 - 0,94), wenngleich im Datensatz B die Durchschnittsmethylierungen der GDM-Gruppen (I-GDM und D-GDM) 0,3 - 1,1 % niedriger waren als die der Kontrollen. Abbildung 25 und Tabelle 29 geben die globale DNA-Methylierung der CpG Subsets an.

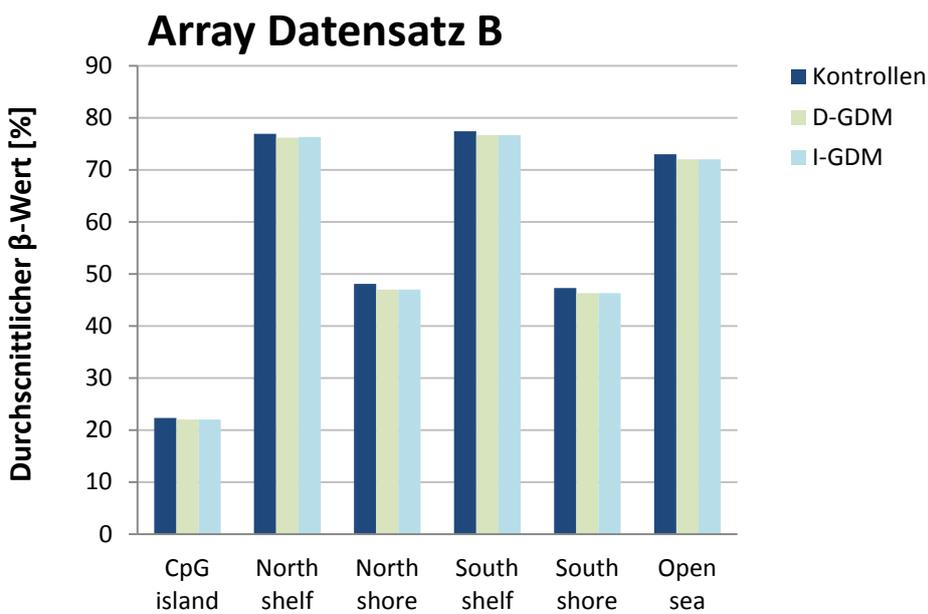
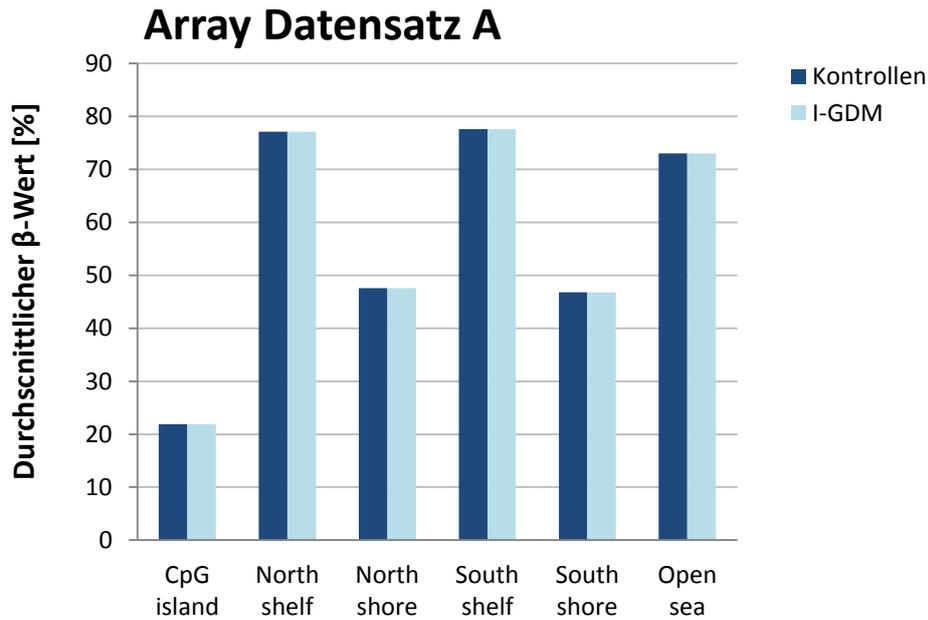


Abbildung 25: Globale DNA-Methylierung der Array-Datensätze

Tabelle 29: Globale DNA-Methylierung unterteilt in CpG Subgruppen

	Array Datensatz A			Array Datensatz B			p-Wert
	Durchschnittsmethylierung		p-Wert	Durchschnittsmethylierung			
	Kontrollen	I-GDM		Kontrollen	D-GDM	I-GDM	
CpG island	21,9%	21,9%	0,59	22,3%	22,0%	22,0%	0,72
North shelf	77,1%	77,1%	0,94	76,9%	76,2%	76,3%	0,16
North shore	47,6%	47,6%	0,90	48,1%	47,0%	47,0%	0,55

South shelf	77,6%	77,6%	0,83	77,4%	76,7%	76,7%	0,12
South shore	46,8%	46,8%	0,63	47,3%	46,3%	46,3%	0,65
Open sea	73,0%	73,0%	0,61	73,0%	72,0%	72,0%	0,94

3.1.2.2 Einzel-CpG Methylierung

Für die Array-Kohorte A konnten auf Einzel-CpG Ebene im Gruppenvergleich keine signifikant differenziell methylierten CpG Stellen detektiert werden, die dem MT standhielten (ohne MT waren 26.964 CpGs signifikant). Ein p-Wert Histogramm über die Verteilung der Signifikanzen deutete jedoch auf eine Anhäufung der p-Werte im unteren signifikanten Bereich hin. Das ist ein Hinweis auf ein Signal in den Daten, wenngleich ein verhältnismäßig schwaches Signal, höchstwahrscheinlich bedingt durch eine zu niedrige Probenzahl. In der Array-Kohorte B konnten nach dem MT 11.195 signifikante CpG Stellen zwischen der I-GDM und der Kontrollgruppe detektiert werden (false discovery rate (FDR)-adjusted für $p < 0,05$). Zwischen der D-GDM Gruppe und den Kontrollen gab es allerdings keine signifikant differenziell methylierten CpGs. Das Fehlen signifikanter CpGs im D-GDM/Kontrollen-Vergleich kann entweder auf die niedrigere Probenzahl zurückgeführt werden (nur 24 D-GDM Proben wurden untersucht, aber 44 I-GDM Proben) oder durch den weniger stark ausgeprägten Krankheits-Phänotypen bei diätisch behandeltem GDM erklärt werden. Für die anschließende Filterung nach der Effektgröße ($\beta \geq 5\%$) wurde deshalb eine komparative Metaanalyse über beide Datensätze hinweg durchgeführt (I-GDM vs. Kontrollen), bei der die D-GDM-Proben ausgeschlossen wurden. Beide Datensätze zeigten eine hohe CpG-weise Methylierungskonkordanz mit $R = 0,999$ ($p < 2,2e-16$), sowie eine signifikante Korrelation der Methylierungsdifferenzen mit $R = 0,126$ ($p < 2,2e-16$) und der t-Werte mit $R = 0,078$ ($p < 2,2e-16$). Daraus kann auf das Vorhandensein eines gemeinsamen Signals in beiden Array-Experimenten geschlossen werden. Die statistische Power kann deshalb über eine kombinierte Auswertung beider Datensätzen (durch die gestiegene Probenzahl) erhöht werden. Dem kombinierten differenziellen Methylierungsvergleich wurde außerdem eine Ordnungsstatistik zweier gleichverteilter Zufallsvariablen zugrunde gelegt. Eine vorangestellte Filterung eliminierte Methylierungsdifferenzen, die für den Diabeteseffekt gegenläufig waren, d.h. in Richtungen mit unterschiedlichen Vorzeichen liefen. Es wurden zwei Kandidaten-Gen Listen erstellt, die zweite für robuste Signale mit insgesamt 65 signifikanten CpG Stellen, die erste für mehr aber eventuell weniger robuste Signale mit

1.564 signifikanten CpGs. Zur Selektion der Gene für das anschließende Validierungsexperiment wurde die zweite Ordnungsstatistik mit 52 genassoziierten CpG Stellen herangezogen (siehe Tabelle 30). Eine Assoziation des HbA1c-Wertes (ebenfalls ein Matching Faktor bei der Probenanordnung auf den Chips) mit der Methylierung ergab nach dem MT keine signifikanten CpG Stellen. Der HbA1c-Wert wurde im Rahmen der Gestationsdiabetes-Diagnose erhoben und war deshalb nur für die GDM-Proben, nicht aber für die Kontrollen verfügbar (mit Ausnahme niedriger Kontroll-IDs die für die Array-Kohorte A verwendet wurden). Das Gewicht und das Gestationsalter des Kindes bei Geburt wurden ebenfalls auf eine Assoziation mit der DNA-Methylierung hin untersucht. Dabei wurden jedoch keine nennenswerten Signifikanzen festgestellt.

Tabelle 30: Array-CpGs mit signifikanten Methylierungsdifferenzen zwischen GDM und Kontrollen

Gen	Array CpG	Chromosomale Lokalisierung ^a	β Differenz Datensatz A	β Differenz Datensatz B	Adjusted p-Wert
<i>CARD11</i>	cg02943336	Chr7: 2.959.067	1,08%	1,33%	0,022
CpG island	cg11449134	Chr19: 51.897.791	-0,63%	-0,63%	0,028
<i>KIAA1530</i>	cg26001655	Chr4: 1.356.770	1,20%	1,25%	0,028
<i>AMPH</i>	cg11010397	Chr7: 38.671.977	-1,37%	-1,81%	0,028
<i>SLC17A4</i>	<u>cg22865713</u>	<u>Chr6: 25.779.897</u>	<u>-2,71%</u>	<u>-3,38%</u>	<u>0,028</u>
<i>DSTN</i>	cg01993865	Chr20: 17.550.690	-0,60%	-0,78%	0,028
<i>ANKFY1</i>	cg18906596	Chr17: 4.151.473	-2,73%	-2,29%	0,028
<i>XPNPEP1</i>	cg05697697	Chr10: 111.683.345	0,66%	0,62%	0,028
<i>CBX7</i>	cg07431064	Chr22: 39.529.217	0,95%	1,12%	0,028
<i>ZC3H3</i>	cg03345925	Chr8: 144.599.347	3,39%	3,83%	0,028
<i>ZNF167</i>	cg06945690	Chr3: 44.621.374	2,09%	2,69%	0,031
<i>SEC24D</i>	cg10576992	Chr4: 119.662.530	-2,73%	-2,83%	0,031
<i>HK3</i>	cg26281025	Chr5: 176.308.046	1,04%	1,38%	0,031
<i>ATF6B</i>	cg08732684	Chr6: 32.095.128	1,79%	2,20%	0,035
<i>ATP5A1</i>	<u>cg23376861</u>	<u>Chr18: 43.678.713</u>	<u>-3,45%</u>	<u>-4,32%</u>	<u>0,035</u>
<i>UCK2</i>	cg21143899	Chr1: 165.866.296	1,42%	1,53%	0,035
North shore	cg02683621	Chr7: 150.100.820	1,15%	1,59%	0,035
Open sea	cg17921080	Chr14: 86.478.932	-1,85%	-2,36%	0,035
<i>PRKAR1B</i>	cg07689396	Chr7: 633.050	1,62%	1,42%	0,035
<i>PRKCH</i>	<u>cg08077807</u>	<u>Chr14: 62.001.072</u>	<u>-2,23%</u>	<u>-2,53%</u>	<u>0,037</u>
CpG island	cg19143209	Chr9: 19.789.287	-2,43%	-2,74%	0,039
North shelf	cg15737302	Chr11: 118.302.063	-1,90%	-1,85%	0,039
<i>MFAP4</i>	<u>cg19169154</u>	<u>Chr17: 19.287.978</u>	<u>1,81%</u>	<u>3,21%</u>	<u>0,039</u>
<i>GAK</i>	cg07018980	Chr4: 895.604	1,04%	1,67%	0,040
CpG island	cg10288510	Chr1: 214.158.727	-1,59%	-0,89%	0,040
<i>SEC16A</i>	cg13153307	Chr9: 139.368.749	1,89%	1,55%	0,040
<i>MAD1L1</i>	cg10778517	Chr7: 2.252.773	0,93%	1,18%	0,040
<i>ATP2C2</i>	cg08440349	Chr16: 84.486.704	1,57%	1,33%	0,040

<i>NOP56,</i> <i>SNORD56/57/86</i>	cg01203331	Chr20: 2.636.597	1,12%	1,49%	0,040
<i>PTGDS</i>	cg18502630	Chr9: 139.871.955	1,44%	1,35%	0,040
<i>TUBB1</i>	cg03246914	Chr20: 57.596.113	-3,22%	-3,05%	0,040
<i>ABCG5; ABCG8</i>	cg26706238	Chr2: 44.066.206	1,35%	1,27%	0,040
<i>TMCC2</i>	cg11703745	Chr1: 205.199.293	1,62%	1,87%	0,040
<i>NELL2</i>	cg19830000	Chr12: 45.270.312	-0,50%	-0,48%	0,041
<i>ZNF76</i>	cg01205011	Chr6: 35.262.113	-2,28%	-2,44%	0,041
CpG island	cg01955962	Chr15: 73.089.536	-0,54%	-0,64%	0,041
<i>XAB2</i>	cg25871543	Chr19: 7.686.181	0,91%	1,41%	0,041
North shelf	cg13984931	Chr1: 162.788.667	-2,47%	-2,10%	0,041
<i>INPP5E</i>	cg13706613	Chr9: 139.324.927	1,36%	1,10%	0,041
North shelf	cg03540894	Chr12: 133.611.606	-2,46%	-2,84%	0,044
North shore	cg01968402	Chr6: 137.817.775	0,71%	0,58%	0,044
<i>HERC3, NAP1L5</i>	cg26406256	Chr4: 89.619.393	1,51%	1,83%	0,046
North shelf	cg04078644	Chr3: 155.458.975	-1,36%	-1,69%	0,046
<i>AGPAT1</i>	cg08542429	Chr6: 32.139.120	1,49%	1,42%	0,046
<i>MTA1</i>	cg04514868	Chr14: 105.931.040	0,92%	1,08%	0,046
<i>ST8SIA2</i>	cg05536286	Chr15: 92.972.514	-1,13%	-1,22%	0,046
<i>OVCA2, DPH1</i>	cg08443019	Chr17: 1.946.299	1,59%	1,41%	0,046
<i>BAI3</i>	cg24119500	Chr6: 69.420.780	-1,93%	-1,77%	0,046
<i>CCDC88B</i>	cg00273340	Chr 11: 64.112.444	1,22%	1,45%	0,046
<i>WHSC2</i>	cg00730857	Chr4: 1.994.281	0,89%	0,90%	0,046
<i>MADD</i>	cg12841566	Chr11: 47.296.317	1,29%	0,94%	0,046
<i>VPS52</i>	cg14088574	Chr6: 33.234.976	1,17%	1,34%	0,046
<i>TTC7A</i>	cg25927444	Chr2: 47.236.103	-2,23%	-1,91%	0,046
<i>CUX1</i>	cg09244071	Chr7: 101.768.746	1,00%	1,38%	0,046
Open sea	cg27509867	Chr8: 129.165.585	1,15%	1,42%	0,046
<i>FAM38A</i>	cg26828643	Chr16: 88.802.820	1,46%	1,51%	0,048
<i>PRDM16</i>	cg22606873	Chr1: 3.144.679	-1,27%	-1,21%	0,048
<i>AKT1</i>	cg16126178	Chr14: 105.239.857	1,11%	1,35%	0,048
CpG island	cg16221240	Chr2: 130.970.934	-3,16%	-2,49%	0,049
<i>GAK</i>	cg03280063	Chr4: 893.186	1,22%	1,58%	0,049
<i>TPCN1</i>	cg00063535	Chr12: 113.729.491	1,35%	1,75%	0,049
<i>PPM1M</i>	cg08144943	Chr3: 52.280.702	2,09%	1,91%	0,049
<i>WDR18</i>	cg17881203	Chr19: 990.398	0,82%	1,40%	0,049
<i>NFKBIA</i>	cg20935025	Chr14: 35.874.013	1,94%	2,70%	0,049
<i>GNAS</i>	cg14597908	Chr20: 57.414.960	1,79%	1,35%	0,049

^a gemäß der Illumina Annotation (humanmethylation450 Manifest).

^β: Methylierungsdifferenz. Chr: Chromosom.

Die mit Pyrosequenzierung analysierten Gene sind durch Unterstreichen hervorgehoben.

Blut besteht aus vielen verschiedenen Zelltypen, deren Zusammensetzung individuell sehr heterogen sein kann und die krankheitsbedingten Schwankungen (z.B. durch Infekte oder Entzündungen hervorgerufen) unterliegt. Das äußert sich auch in individuell unterschiedlichen DNA Methylierungsprofilen. Bei krankheitsassoziierten epigenomweiten

Studien ist es daher essentiell, dass zwischen den Untersuchungsgruppen keine signifikanten Unterschiede in der Zellkomposition bestehen, was standardmäßig überprüft werden sollte. Für die untersuchten Nabelschnurblut-Proben waren aber keine individuellen Blutbilder mit Messungen der Leukozyten-Verteilung in der Geburtsklinik erstellt worden. Anhand der Array-Methylierungsprofile ist es dennoch möglich, die Blutzellzusammensetzung nachträglich bioinformatisch zu schätzen und zu bewerten. Unter Zuhilfenahme publizierter statistischer Tools und Software für 450 K Microarrays [230] wurde die Verteilung der Leukozyten-Typen vorhergesagt und in Abbildung 26 dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Blutkompositionsunterschiede zwischen der GDM-Gruppe und den Kontrollen, auch nicht nach Adjustierung des Modells um die angenommene Zellzahl.

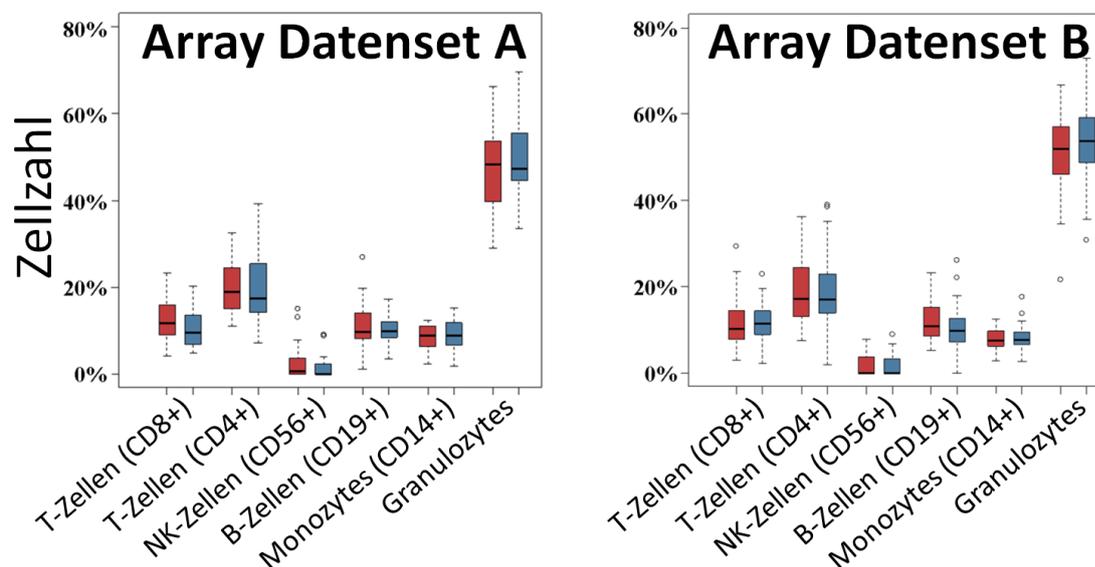


Abbildung 26: Abschätzung der Blutzellzusammensetzung

GDM Proben wurden durch blaue Boxplots gekennzeichnet, Kontroll-Proben durch rote Boxplots. Der Median ist als horizontale Linie dargestellt. Die Boxplots sind jeweils von der 25% Quartile bis zur 75% Quartile angegeben. Ausreißer sind als Kreise abgebildet (zwischen $> 1,5x$ IQR und $< 3x$ IQR) NK-Zelle: Natürliche Killerzelle.

3.1.2.3 pH-Gruppenvergleich im Microarray-Datensatz A

Im Datensatz A wurde außerdem ein Gruppenvergleich zwischen einer low-pH-Gruppe ($pH < 7,24$) und einer non-low-pH-Gruppe ($pH > 7,24$) durchgeführt, bei dem nicht nach den GDM-Gruppen unterschieden wurde. Dabei wurde ein einziges signifikantes CpG mit einem FDR adjusted p-Wert von $p = 0,013$ gefunden, das sich innerhalb des *ADAP1*-Gens befand. Im

Datensatz B wurde dieser Vergleich nicht durchgeführt. Um dieses Ergebnis genauer zu untersuchen und gegebenenfalls bestätigen zu können, wurde ein Pyrosequenzierungsassay mit zwei Sequenzierungsprimern designt, der das Array-CpG (cg19163939, CpG1 in Assay1) und vier weitere CpGs abdeckte (siehe Abbildung 27 und Tabelle 9).

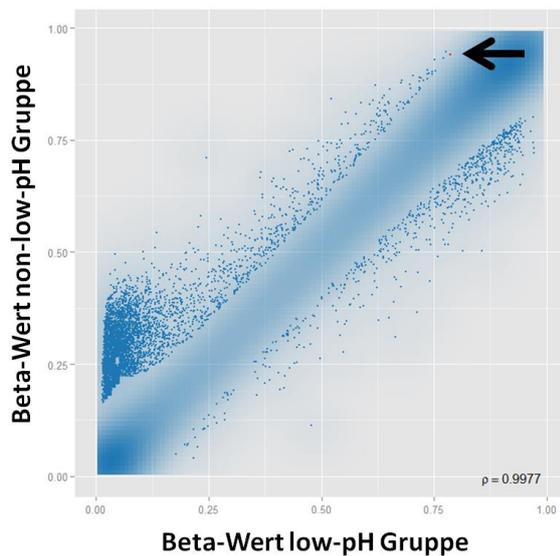


Abbildung 27: RnBeads pH-Gruppen-Vergleich im Array-Datensatz A

Untersuchungsgruppen: 1 low-pH-Gruppe: pH < 7,24; 2 non-low-pH-Gruppe: pH > 7,25

p-Wert des *ADAP1*-assoziierten CpGs im Gruppenvergleich (roter Punkt): $p^* = 0.013$ (FDR adjusted).

3.1.3 Validierung der Kandidaten-Gene mittels Pyrosequenzierung

Die Validierungskohorte umfasste 181 Proben, inklusive der 132 Array-Proben. Die klinischen Parameter der Pyrosequenzierungskohorte sind in Tabelle 2 angegeben. Wie auch schon in den beiden Array-Kohorten, war auch hier das mütterliche Gewicht vor der Schwangerschaft ($p < 0,001$) bzw. der Geburt ($p < 0,001$) und der daraus berechnete maternale BMI ($p < 0,001$) in den GDM-Proben signifikant höher als in den Kontrollen. Das Gestationsalter (SSW) war mit $p = 0,007$ in den GDM Proben niedriger als in den Kontrollen und es wurden signifikant mehr Kaiserschnitte durchgeführt ($p = 0,041$). Die HbA1c-Werte der I-GDM Proben waren signifikant höher als die der D-GDM Proben ($p < 0,001$), insgesamt aber im Normalbereich.

3.1.3.1 Selektion der Kandidaten-Gene für die Validierung

Aus der Kandidaten-Gen Liste des Array-Screens mit 65 differenziell methylierten CpGs (zweite Ordnungsstatistik, Tabelle 30) wurden die vier Gene *ATP5A1*, *MFAP4*, *PRKCH* und *SLC17A4* für die Validierung der Array-Funde ausgewählt. Die Selektionskriterien waren die Assoziation des Array-CpGs mit einem Gen (zwölf CpGs waren nicht genassoziiert und wurden daher ausgeschlossen), ein vergleichsweise hoher und damit einfacher zu reproduzierender Methylierungsunterschied der Gruppen (> 2%) und eine Assoziation der Gene mit Adipositas oder Diabetes in der Literatur. *ATP5A1*, *MFAP4*, *PRKCH* und *SLC17A4* sind zwar nicht als typische Diabetes-Gene bekannt, aber indirekt oder direkt im Zusammenhang mit metabolischen Erkrankungen aufgefallen [231-237]. Das *HIF3A*-Gen war nicht unter den Top-Kandidaten-Genen der Array-Screens, sondern wurde aus der Literatur eruiert, da es bekanntermaßen mit der Adipozyten-Differenzierung assoziiert ist [238-241].

Das *ATP5A1*-Amplikon war in der Promotorregion des Gens lokalisiert und umfasste drei Pyrosequenzierungsassays, die je zwei bis drei CpG Stellen abdeckten (siehe Abbildung 6). Der Methylierungsdurchschnitt des ersten Pyroassays war 66,33 %, für die Pyroassays zwei und drei dagegen nur 1,20 %. Für benachbarte CpGs, die funktionell miteinander verknüpft sind, würde man auch vergleichbar hohe Methylierungswerte erwarten. Eine über 60%ige Abweichung zwischen zwei Assays weist darauf hin, dass die CpGs höchstwahrscheinlich Regionen mit unterschiedlichen biologischen Funktionen zuzuordnen sind. Für die finale Auswertung wurde daher nur der erste Assay mit zwei CpGs verwendet (siehe Abbildung 6, Tabelle 9). Das Array-CpG entspricht dem zweiten CpG des Pyrosequenzierungsassays. Für *MFAP4* ist das Array-CpG das vierte CpG des Pyroassays, für *PRKCH* das dritte und für *SLC17A4* ebenfalls das dritte CpG. In Abbildung 28 sind die Array-CpGs mit Pfeilen gekennzeichnet.

3.1.3.2 Array Gruppen- und Subgruppenvergleich

Die p- und β -Werte im Gruppen- und Subgruppenvergleich sind in Tabelle 31 aufgelistet. Für *ATP5A1* zeigte das Array-CpG eine signifikante Methylierungsdifferenz zwischen der Gesamt-GDM Gruppe und den Kontrollen ($\beta = -2,0\%$; $p = 0,014$), ebenso für die I-GDM Gruppe und die Kontrollen ($\beta = -3,2\%$; $p = 0,001$). Auch der Durchschnitt über alle CpGs war in diesem Subgruppenvergleich signifikant ($\beta = -2,2\%$; $p = 0,007$). Im D-GDM/Kontrollen-Vergleich

konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Das *MFAP4*-Amplikon enthielt insgesamt vier CpGs in einer, den Promotor flankierenden, Region. Für *MFAP4* wurden keine signifikanten Methylierungsunterschiede gefunden, weder auf Array-CpG Ebene noch über den Gesamtdurchschnitt aller CpGs hinweg. Einzig das zweite CpG zeigte eine schwache Signifikanz mit $p = 0,048$ ($\beta = -0,4\%$) im I-GDM/Kontrollen-Subgruppen Vergleich. Das *PRKCH*-Amplikon umfasste insgesamt drei CpGs in einer Enhancer Region. Alle Einzel-CpGs sowie der Durchschnitt aller CpGs war im GDM/Kontroll-Vergleich signifikant niedriger methyliert in den GDM Proben. Die Methylierungsdifferenz des Durchschnitts war $\beta = -1,4\%$ mit $p < 0,001$, die Differenz des Array-CpGs betrug $\beta = -1,3\%$ mit $p = 0,005$. Im I-GDM/Kontrollen-Vergleich wurde eine noch ausgeprägtere Hypomethylierung der I-GDM-Subgruppe detektiert mit $\beta = -1,9\%$ ($p < 0,001$) für das Array-CpG und $\beta = -1,6\%$ ($p < 0,001$) für den Gesamtdurchschnitt. Eine Hypomethylierung konnte auch für die D-GDM-Subgruppe festgestellt werden, allerdings abgeschwächer mit einer Methylierungsdifferenz von $\beta = -1,2\%$ ($p = 0,015$). Der Methylierungsunterschied des Array-CpGs war mit $\beta = -0,7\%$ nicht signifikant. Übereinstimmend mit den Array-Ergebnissen wurde auch für *SLC17A4* eine Hypomethylierung im Array-CpG des Pyroassays gefunden. Der β -Wert war für GDM/Kontrollen $\beta = -0,8\%$ und für I-GDM/Kontrollen $\beta = -2,0\%$, jedoch in beiden Fällen nicht signifikant. Für die D-GDM-Gruppe wurde sogar eine schwache Hypermethylierung detektiert. Auffallend war jedoch eine sehr starke Hypermethylierung ($\beta = 4.4-5.2\%$) des zweiten CpGs des Pyroassays, welches upstream nur 141 bp vom dritten CpG (Array-CpG) entfernt liegt (siehe Abbildung 6 und Abbildung 28). Besagtes CpG war für die GDM-Gruppe, aber auch für die beiden Subgruppen (D-GDM und I-GDM) signifikant differenziell methyliert ($p < 0,001$) im Vergleich zu den Kontrollen. Die Methylierungsdifferenz zwischen den benachbarten CpG Dinukleotiden CpG2 und CpG3 betrug 4,5-6,5% und war damit signifikant höher in allen GDM-Gruppen im Vergleich zu den Kontrollen ($p < 0,001$). Das *HIF3A*-Amplikon ist im Promotor lokalisiert und deckt insgesamt elf CpG Stellen ab, von denen drei auch im Microarray repräsentiert waren (CpG6, CpG8 und CpG11), dort aber nicht aufgefallen sind d.h. nicht Teil der 65 Kandidaten-Loci waren. In allen Vergleichen war die Durchschnittsmethylierung der elf CpGs in den GDM-, I-GDM- und D-GDM-Proben signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen ($\beta = 1,3\% - 1,5\%$; $p < 0,001 - p = 0,005$). Betrachtet man Einzel-CpGs so waren CpG2 und CpG8 in keinem Vergleich signifikant differenziell methyliert, die CpGs 3, 4, 5, 10 und 11 hingegen in allen Vergleichen. Im I-GDM/Kontrollen-

bzw. im D-GDM/Kontrollen-Vergleich fielen jeweils sechs von elf CpGs durch Signifikanz auf. Wurden I-GDM und D-GDM Proben zusammengefasst, sogar neun von elf CpGs. Summa summarum lässt sich feststellen, dass mit Ausnahme von *MFAP4* für alle Gene der GDM-Effekt im Validierungsexperiment bestätigt werden konnte und stärker in der I-GDM-Subgruppe zum Tragen kam als in der D-GDM-Subgruppe. Dieser Fund ist deckungsgleich mit den Array-Ergebnissen. Auch dort war der Methylierungsunterschied im I-GDM/Kontrollen-Vergleich deutlich stärker, als wenn man D-GDM-Proben mit Kontrollen verglich.

Tabelle 31: β -Werte und p-Werte der Gruppen- und Subgruppenvergleiche

Gen	Vergleich	Array CpG	Durchschnitt alle CpGs
<i>ATP5A1</i> (Promotor)	GDM vs. Kontrollen	$\beta = -2,0\%$; $p = 0,014^*$	$\beta = -1,3\%$; $p = 0,125$
	D-GDM vs. Kontrollen	$\beta = -0,5\%$; $p = 0,524$	$\beta = -0,03\%$; $p = 0,991$
	I-GDM vs. Kontrollen	$\beta = -3,2\%$; $p = 0,001^{**}$	$\beta = -2,2\%$; $p = 0,007^{**}$
<i>MFAP4</i> (Promotor-flanking)	GDM vs. Kontrollen	$\beta = -0,8\%$; $p = 0,336$	$\beta = -0,3\%$; $p = 0,348$
	D-GDM vs. Kontrollen	$\beta = -1,14\%$; $p = 0,183$	$\beta = -0,3\%$; $p = 0,291$
	I-GDM vs. Kontrollen	$\beta = -0,4\%$; $p = 0,558$	$\beta = -0,2\%$; $p = 0,475$
<i>PRKCH</i> (Enhancer)	GDM vs. Kontrollen	$\beta = -1,3\%$; $p = 0,005^{**}$	$\beta = -1,4\%$; $p < 0,001^{**}$
	D-GDM vs. Kontrollen	$\beta = -0,7\%$; $p = 0,215$	$\beta = -1,2\%$; $p = 0,015^*$
	I-GDM vs. Kontrollen	$\beta = -1,9\%$; $p < 0,001^{**}$	$\beta = -1,6\%$; $p < 0,001^{**}$
<i>SLC17A4</i>	GDM vs. Kontrollen	$\beta = -0,8\%$; $p = 0,644$	$\beta = -1,2\%$; $p = 0,002^{**}$
	D-GDM vs. Kontrollen	$\beta = +0,7\%$; $p = 0,479$	$\beta = +2,0\%$; $p < 0,001^{**}$
	I-GDM vs. Kontrollen	$\beta = -2,0\%$; $p = 0,121$	$\beta = +0,8\%$; $p = 0,064$
<i>HIF3A</i> (Promotor)	GDM vs. Kontrollen		$\beta = +1,3\%$; $p = 0,001^{**}$
	D-GDM vs. Kontrollen		$\beta = +1,0\%$; $p = 0,002^{**}$
	I-GDM vs. Kontrollen		$\beta = +1,5\%$; $p = 0,005^{**}$

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; β : Methylierungsdifferenz.
Signifikante CpGs sind in grauer Schrift hervorgehoben.

3.1.3.3 Multivariate Regressionsanalyse

Wie bereits erwähnt, war es nicht für alle klinischen Parameter möglich die Proben perfekt zu matchen. Dies fiel besonders für die Pyrosequenzierungsdaten ins Gewicht, da dort eine wesentlich größere Probenzahl als in den beiden Microarray-Experimenten untersucht wurde. Um die eventuelle Beeinflussung der Ergebnisse durch Confounding-Faktoren herauszurechnen und sicherzugehen, dass es sich bei den Ergebnissen insgesamt um glaubhafte Effekte und keine Artefakte handelte, wurde ein multivariates Regressionsmodell berechnet, das die Faktoren mütterlicher BMI, Gestationsalter und Geschlecht des Kindes berücksichtigte. Die Methylierungsdifferenzen nach dem Adjustment sind in Abbildung 28 CpG-weise für die fünf untersuchten Gene dargestellt. Zugrunde gelegt wurde dem Modell ein Vergleich zwischen GDM-Proben (I-GDM und D-GDM) und Kontrollen. Die zugehörigen β -

und p-Werte sind in Tabelle 32 zu finden. Der GDM-Effekt hielt dem statistischen Berichtigungsmodell stand. Für *ATP5A1* zeigte das Array-CpG (CpG2) einen signifikanten Methylierungsunterschied ($\beta = -2,2\%$; $p = 0,021$), genau wie das Array-CpG (CpG4) für *MFAP4* ($\beta = -0,3\%$; $p = 0,036$). Für *PRKCH* zeigten alle untersuchten CpGs und auch der Durchschnitt über alle drei CpGs hinweg signifikante Gruppenunterschiede ($\beta = -1,1\% - (-)1,9\%$; $p = 0,003 - 0,047$). Das Array-CpG (CpG3) für *SLC17A4* war erwartungsgemäß hypomethyliert mit $\beta = -1,3$, allerdings nicht signifikant, im Gegensatz zu CpG2 ($\beta = 5,2\%$; $p < 0,001$) und dem Durchschnitt ($\beta = 1,5\%$; $p = 0,033$), die beide hypermethyliert und signifikant waren. Für *HIF3A* zeigte sich eine signifikante differenzielle Methylierung in vier CpGs (CpG5, 6, 10 und 11) und im Amplikon-Durchschnitt mit $\beta = 1,7\% - 3,6\%$ ($p = 0,011 - p = 0,049$).

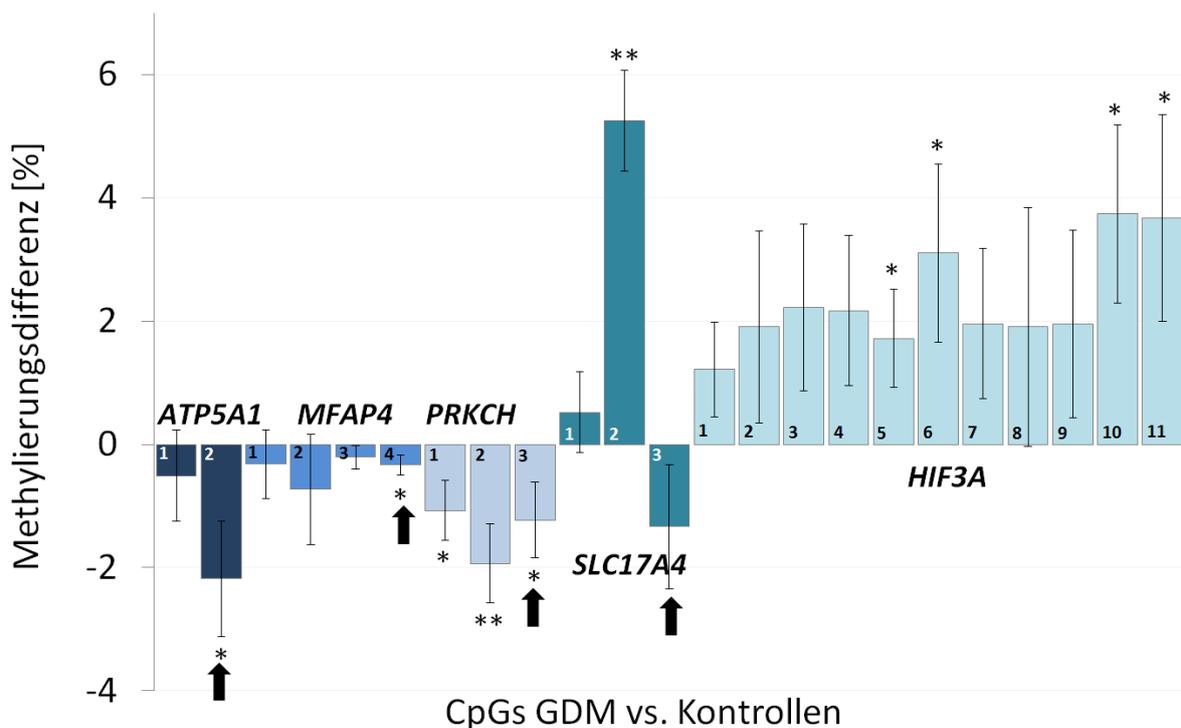


Abbildung 28: Methylierungsdifferenz der Pyrosequenzierung GDM vs. Kontrollen

Die Methylierungsdifferenz von GDM minus Kontrollen wurde für alle mit der Pyrosequenzierung untersuchten Gene CpG-weise dargestellt. Untersucht wurde Nabelschnurblut. Für die zugrundeliegende Berechnung wurde der maternale BMI, das Gestationsalter sowie das Geschlecht des Kindes als Confounding-Faktoren berücksichtigt und herausgerechnet. Die Pfeile markieren diejenigen CpGs, die im Array signifikante Gruppenunterschiede gezeigt hatten. Das Signifikanzniveau entsprach * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Tabelle 32: Multivariate Regressionsanalyse der Pyrosequenzierungsdaten

Gen	CpG site (Pyro)	β -Wert	SE	p-Wert	CI (unten)	CI (oben)
<i>ATP5A1</i>	CpG 1	-0,508	0,737	0,492	-1,963	0,948
<u>ATP5A1</u>	<u>CpG 2</u>	<u>-2,182</u>	<u>0,934</u>	<u>0,021*</u>	<u>-4,025</u>	<u>-0,338</u>
<u>ATP5A1</u>	<u>CpGs 1-2</u>	<u>-1,345</u>	<u>0,771</u>	<u>0,083</u>	<u>-2,868</u>	<u>0,177</u>
<i>MFAP4</i>	CpG 1	-0,321	0,554	0,563	-1,414	0,773
<i>MFAP4</i>	CpG 2	-0,730	0,891	0,414	-2,490	1,030
<i>MFAP4</i>	CpG 3	-0,211	0,196	0,283	-0,599	0,176
<u>MFAP4</u>	<u>CpG 4</u>	<u>-0,337</u>	<u>0,159</u>	<u>0,036*</u>	<u>-0,651</u>	<u>-0,022</u>
<u>MFAP4</u>	<u>CpGs 1-4</u>	<u>-0,411</u>	<u>0,342</u>	<u>0,232</u>	<u>-1,087</u>	<u>0,265</u>
<i>PRKCH</i>	CpG 1	-1,073	0,489	0,030*	-2,039	-0,107
<i>PRKCH</i>	CpG 2	-1,932	0,644	0,003*	-3,204	-0,661
<u>PRKCH</u>	<u>CpG3</u>	<u>-1,228</u>	<u>0,614</u>	<u>0,047*</u>	<u>-2,439</u>	<u>-0,017</u>
<u>PRKCH</u>	<u>CpGs 1-3</u>	<u>-1,372</u>	<u>0,512</u>	<u>0,008*</u>	<u>-2,382</u>	<u>-0,363</u>
<i>SLC17A4</i>	CpG 1	0,520	0,654	0,428	-0,771	1,811
<i>SLC17A4</i>	CpG 2	5,248	0,817	<0,001**	3,634	6,861
<u>SLC17A4</u>	<u>CpG 3</u>	<u>-1,335</u>	<u>1,009</u>	<u>0,188</u>	<u>-3,326</u>	<u>0,657</u>
<u>SLC17A4</u>	<u>CpGs 1-3</u>	<u>1,452</u>	<u>0,677</u>	<u>0,033*</u>	<u>0,116</u>	<u>2,789</u>
<i>HIF3A</i>	CpG 1	1,219	0,768	0,114	-0,297	2,735
<i>HIF3A</i>	CpG 2	1,905	1,559	0,223	-1,172	4,983
<i>HIF3A</i>	CpG 3	2,216	1,355	0,104	-0,459	4,891
<i>HIF3A</i>	CpG 4	2,165	1,218	0,077	-0,240	4,570
<i>HIF3A</i>	CpG 5	1,719	0,799	0,033*	0,142	3,296
<i>HIF3A</i>	CpG 6	3,101	1,441	0,033*	0,257	5,945
<i>HIF3A</i>	CpG 7	1,953	1,220	0,111	-0,455	4,360
<i>HIF3A</i>	CpG 8	1,903	1,937	0,327	-1,922	5,727
<i>HIF3A</i>	CpG 9	1,956	1,522	0,201	-1,049	4,962
<i>HIF3A</i>	CpG 10	3,737	1,449	0,011*	0,875	6,598
<i>HIF3A</i>	CpG 11	3,666	1,677	0,030*	0,355	6,976
<u>HIF3A</u>	<u>CpGs 1-11</u>	<u>2,315</u>	<u>1,168</u>	<u>0,049*</u>	<u>0,008</u>	<u>4,622</u>

*p<0,05; **p<0,01; β : Methylierungsdifferenz; SE: standard error (SE), CI: 95% confidence interval.

Signifikante CpGs sind in schwarzer Schrift dargestellt, nicht signifikante CpGs in grauer Schrift.

Die Array-CpGs sind durch Unterstriche markiert.

Die Pyrosequenzierungsdaten wurden in diesem multivariaten Regressionsmodell statistisch für die Confounding-Faktoren maternaler BMI, Gestationsalter und fetales Geschlecht berichtigt. Das Modell bezieht sich auf einen GDM vs. Kontrollen Gruppenvergleich.

3.1.3.4 ADAP1-Validierung im pH-Gruppenvergleich

Für *ADAP1* wurden zwei Pyrosequenzierungsassays konzipiert, die insgesamt fünf CpGs umfassten und sich, in einer den Promotor flankierenden Region, befanden. Der erste Assay deckte drei CpGs ab (inklusive des Array-CpGs), der zweite Assay deckte zwei weitere CpGs ab. Abbildung 29 zeigt für jeden Gruppenunterschied das Array-CpG und die Durchschnittsmethylierung über alle fünf CpGs hinweg. Anhand der pH-Verteilung der Pyrosequenzierungskohorte (siehe Tabelle 2) wurde eine Einteilung in pH-Gruppen vorgenommen: low (pH < 7,24; n = 37), normal (pH = 7,24-7,29; n = 54) und high (pH > 7,29; n = 82). Diese sind als Drei-Gruppenvergleich oder Zwei-Gruppenvergleich (normal und high als non_low zusammengefasst, pH > 7,24 n = 136) in Abbildung 29 dargestellt und wurden mit dem Mann-Whitney-U Test (MWU) bzw. dem Kruskal-Wallis Test (H-Test) statistisch ausgewertet. Der Zwei-Gruppenvergleich entsprach dabei der Auswertung des Array-Datensatzes A, bei dem ein signifikanter Unterschied im cg19163939 (CpG1 Assay1 des Pyroassays) gefunden wurde. Mit der Pyrosequenzierung konnte dieser Unterschied jedoch nicht bestätigt werden. Die Methylierungsdifferenz zwischen der low-Gruppe und der non_low-Gruppe betrug für das Array-CpG nur -0,35% und für den Durchschnitt -0,53% und war damit nicht signifikant. Im Drei-Gruppenvergleich waren weder der Durchschnitt noch Einzel-CpGs signifikant, im Zwei-Gruppenvergleich zeigte ausschließlich das CpG2 Assay2 ($p = 0,036$) eine signifikante Differenz. Im GDM/Kontrollen-Vergleich wurden für dieses Gen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede gefunden (siehe Abbildung 29). Einzige Ausnahme war CpG2 Assay2 mit $p = 0,004$.

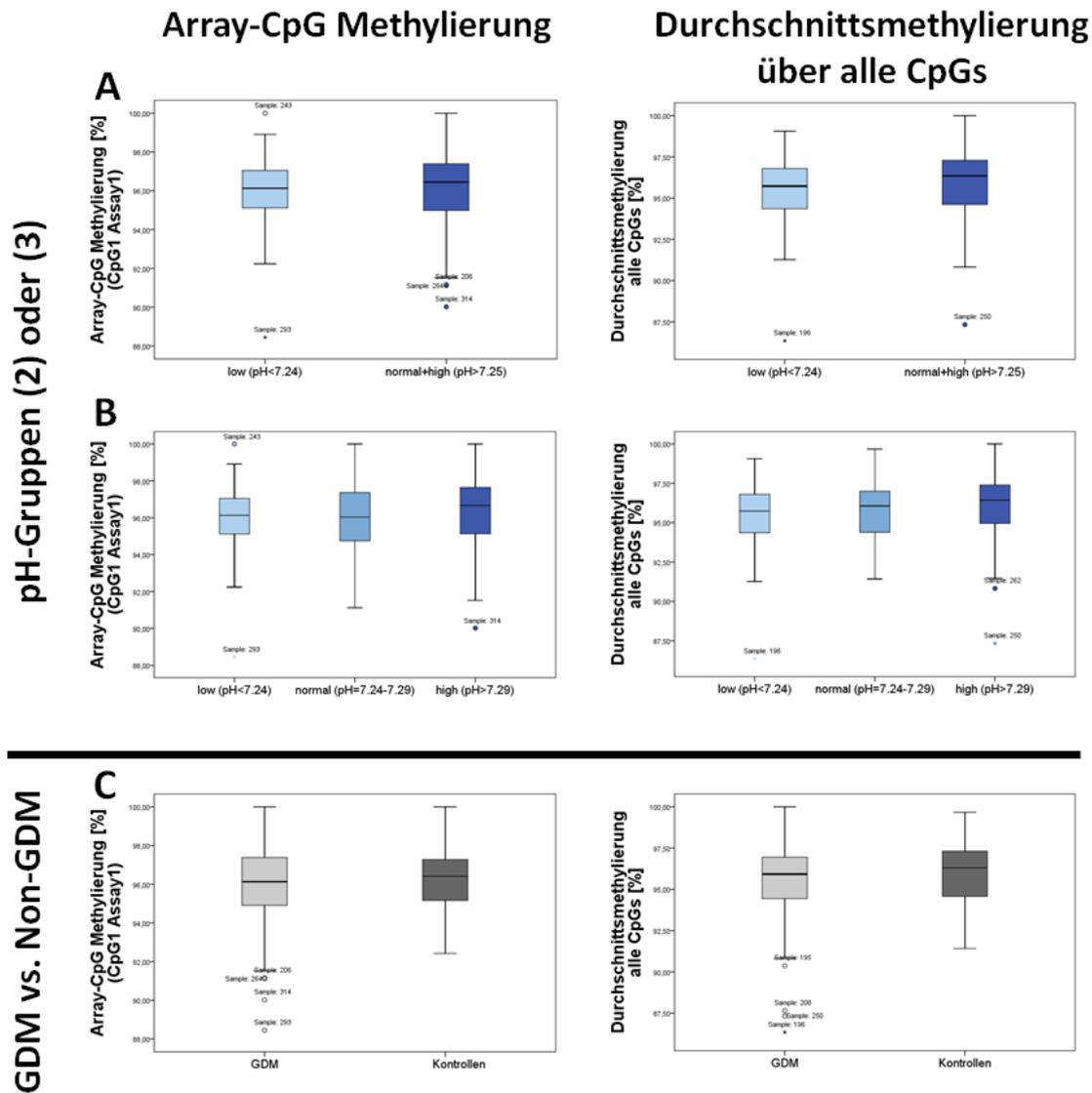


Abbildung 29: ADAP1-Pyrosequenzierungsergebnisse im Gruppenvergleich

Untersuchungsgruppen:

- A) pH-Gruppen (2): 1 low (pH < 7,24); 2 non_low (pH > 7,25)
- B) pH-Gruppen (3): 1 low (pH < 7,24); 2 normal (pH = 7,24-7,29); 3 high (pH > 7,29)
- C) Gestationsdiabetes-Gruppen: 1 GDM; 2 Kontrollen

Im Boxplot angegeben ist der Median, die 25% Quartile, die 75% Quartile, sowie Minimum und Maximum. Kreise kennzeichnen „milde“ Ausreißer (zwischen > 1,5x IQR und < 3x IQR), Sterne markieren „extreme“ Ausreißer (> 3x IQR). Das Array-CpG, sowie die Durchschnittsmethylierung zeigten in keinem Gruppenvergleich signifikante Unterschiede. Das Signifikanzniveau entsprach *p<0,05; **p<0,01.

3.2 DBS-Studie zur Hypermethylierung des nicht-geprägten Allels (HNA)

In dieser Arbeit wurde mittels DBS das allel-spezifische Methylierungsprofil von gegensätzlich geprägten (mütterlich bzw. väterlich exprimierten) Genen untersucht. Dabei wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Library-Anfertigung und Sequenzierung verwendet, die Roche GS Junior NGS Technologie und der Illumina MiSeq Sequenzierer in Verbindung mit einem selbst entwickelten und etablierten Protokoll. Der maternal methylierte (maternal geprägte) *MEST* Promotor und die paternal methylierte (paternal geprägte) *MEG3* IG-DMR wurden mit dem Roche GS Junior in den drei Geweben FCB, AB und VAT analysiert und die dabei gefundenen Effekte mit Hilfe der moderneren Illumina MiSeq Technologie in unabhängigen FCB-Proben validiert. Darüber hinaus wurden zwei weitere invers geprägte Loci untersucht, der paternal methylierte (paternal geprägte) *MEG3* Promotor und der maternal methylierte (maternal geprägte) *PEG3* Promotor. DBS erlaubt eine Sequenzierung auf Einzel-Allel/Einzel-Read Ebene und die Unterscheidung nach dem parentalen Allel-Ursprung basierend auf einer Vorauswahl von heterozygoten Proben (IDs) durch die Genotypisierung eines informativen SNPs in der Zielregion. Da nur geprägte Gene untersucht wurden, konnte anhand der Durchschnittsmethylierung der nach dem SNP aufgeteilten Allele auf die elterliche Herkunft geschlossen werden. Alle Ergebnisse sind im Paper „Hypermethylation of the non-imprinted maternal *MEG3* and paternal *MEST* alleles is highly variable among normal individuals“ zusammengefasst und wurden 2017 in PLoS One veröffentlicht [242].

3.2.1 DBS mit dem Roche GS Junior

3.2.1.1 Run-Parameter und Methylierung (mit und ohne Allel-Separierung)

Die durchschnittlichen Parameter der kombinierten Roche GS Junior Läufe sind in Tabelle 33 aufgelistet. Die Read-Zahl betrug 796 ± 261 Reads für die *MEG3* IG-DMR und 1.036 ± 355 Reads für den *MEST* Promotor. Die SNP Ratio wurde berechnet aus der Anzahl der Reads für ein Allel geteilt durch die Anzahl der Reads für das zweite Allel und sollte idealerweise bei 1 liegen. Eine Abweichung von 1 besagt, es wurden nicht gleich viele Reads für die beiden elterlichen Allele detektiert und zeigt demnach einen Amplifikationsbias an. Für *MEG3* IG-DMR lag die SNP Ratio bei $0,78 \pm 0,14$, für *MEST* bei $0,72 \pm 0,23$. Die Amplifikation

bisulfitkonvertierter DNA ist deutlich anspruchsvoller als genomischer unkonvertierter DNA. Da bisulfitkonvertierte DNA fragmentiert vorliegt, wird aus dem Vier-Basen-Code ein Drei-Basen-Code (für unmethylierte Templates). Dadurch wird an Diversität verloren, was unspezifische Primerbindung wahrscheinlicher macht. Eine besondere Herausforderung liegt auch darin, in der gleichen Reaktion methyliertes und unmethyliertes Template zu amplifizieren, wie es bei geprägten Genen der Fall ist. Das bisulfitkonvertierte unmethylierte Allel unterscheidet sich in der Basensequenzabfolge vom methylierten Allel, was zu geringfügig unterschiedlichen Schmelztemperaturen führen kann. Es ist bekannt, dass innerhalb solcher Reaktionen das unmethylierte Allel präferenziell amplifiziert wird [243, 244], wahrscheinlich auch bedingt durch Sekundärstruktureffekte des GC-reicheren methylierten Allels [245]. Für *MEST* sind Drop-Out Effekte des methylierten maternalen Allels bereits beschrieben [246]. Bei Analysen auf Einzel-Molekül Ebene wäre ein spezifisches single molecule tagging (SMT) wünschenswert, wodurch Bias-Effekte nachträglich herausgerechnet werden könnten. Für Amplikon-Sequenzierungen ist so etwas jedoch derzeit noch mit keinem Protokoll umsetzbar.

Tabelle 33: Roche GS Junior Run-Parameter

Gen	Gewebe	n	Reads (Mittelwert \pm SD)	SNP Ratio (Mittelwert \pm SD)
<i>MEG3</i> IG-DMR	FCB	30	802 \pm 305	0,79 \pm 0,15
	AB	23	760 \pm 216	0,73 \pm 0,12
	VAT	13	775 \pm 231	0,77 \pm 0,16
	alle	66	796 \pm 261	0,78 \pm 0,14
<i>MEST</i>	FCB	50	1.053 \pm 351	0,65 \pm 0,26
	AB	36	1.197 \pm 363	0,74 \pm 0,20
	VAT	24	759 \pm 142	0,84 \pm 0,09
	alle	110	1.036 \pm 355	0,72 \pm 0,23

Aufgelistet ist die Gesamtanzahl der untersuchten Proben (n) pro Gewebe, die durchschnittliche Readzahl, sowie die durchschnittlichen SNP Ratios.

FCB: fetal cord blood; AB: adult blood; VAT: visceral adipose tissue; SD: standard deviation.

Für *MEG3* IG-DMR wurden insgesamt 30 FCB, 23 AB, und 13 VAT Proben untersucht, für *MEST* 50 FCB, 36 AB und 24 VAT Proben. Bei geprägten Genen erwartet man ohne Allel-Separierung eine durchschnittliche hypothetische Methylierung von ungefähr 50 %. *MEG3* IG-DMR zeigte in allen drei Geweben eine leichte Hypermethylierung mit 55,6 \pm 4,6 % in FCB, 59,7 \pm 7,0 % in AB und 59,1 \pm 6,8 % in VAT (siehe

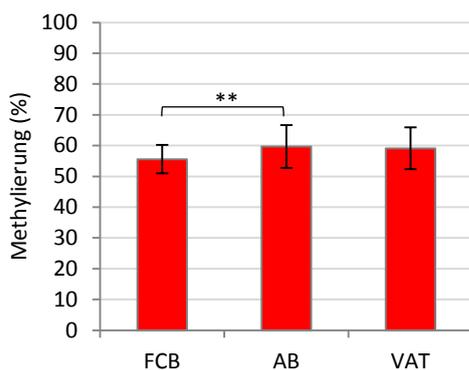
Tabelle 34) und einem signifikanten Gruppenunterschied zwischen FCB und AB ($p < 0.001$, t-Test), dargestellt in Abbildung 30. Für *MEST* entsprach die Methylierung ziemlich genau den Erwartungen mit $51,6 \pm 16,6$ % in FCB, $48,9 \pm 10,8$ % in AB und $51,1 \pm 5,0$ % in VAT.

Tabelle 34: Roche GS Junior Methylierung ohne Allel-Unterscheidung

Gen	Gewebe	n	Methylierung (%)			
			Min	Max	Mittelwert	SD
<i>MEG3</i> IG-DMR	FCB	30	44,4	65,2	55,6	4,6
	AB	23	51,1	79,1	59,7	7,0
	VAT	13	50,5	70,4	59,1	6,8
<i>MEST</i>	FCB	50	13,5	74,0	51,6	16,6
	AB	36	27,0	70,8	48,9	10,8
	VAT	24	40,2	62,5	51,1	5,0

FCB: fetal cord blood; AB: adult blood; VAT: visceral adipose tissue; SD: standard deviation; Min: Minimum; Max: Maximum.

A *MEG3* IG-DMR



B *MEST*

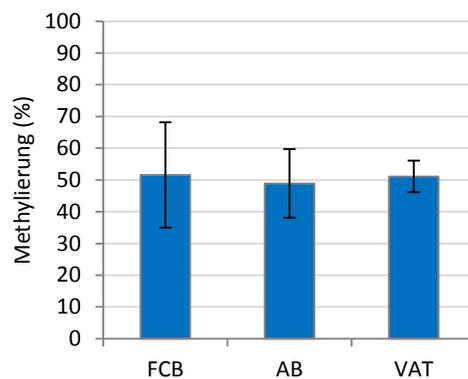


Abbildung 30: Roche GS Junior Methylierung ohne Allel-Unterscheidung

A: *MEG3* IG-DMR; B: *MEST*. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Das Signifikanzniveau entsprach $*p < 0,05$; $**p < 0,01$.

FCB: fetal cord blood; AB: adult blood; VAT: visceral adipose tissue.

Um die beiden parentalen Allele zu separieren, wurde für *MEG3* IG-DMR der SNP rs7159412 und für *MEST* der SNP rs2301335 herangezogen. Die Methylierung der beiden Allele kann Tabelle 35 entnommen werden. *MEG3* ist ein maternal exprimiertes Gen. Das höher methylierte Allel einer Probe kann demnach eindeutig als paternales Allel, das niedriger methylierte Allel als maternales Allel identifiziert werden. Das paternale Allel war mit $92,2 \pm 3,0$ %, $93,1 \pm 2,4$ % und $92,7 \pm 3,5$ % in FCB, AB und VAT relativ nahe an den

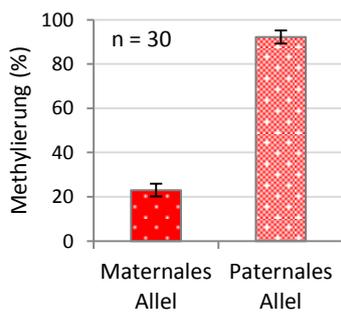
erwarteten 100 %. Das maternale Allel, das erwartungsgemäß vollständig unmethyliert sein sollte, zeigte Methylierungslevel von $23,0 \pm 2,9$ % für FCB, $30,0 \pm 8,6$ % für AB und $29,5 \pm 9,2$ % für VAT und damit eine beachtliche Hypermethylierung. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für *MEST* festgestellt. Die Methylierung des methylierten maternalen Allels betrug $93,3 \pm 4,6\%$ in FCB, $93,8 \pm 1,8\%$ in AB und $95,5 \pm 1,1\%$ in VAT. Die Methylierung des unmethylierten paternalen Allels war $21,7 \pm 12,5\%$ in FCB, $15,1 \pm 8,8\%$ in AB und $11,1 \pm 4,3\%$ in VAT.

Tabelle 35: Roche GS Junior Methylierung der beiden elterlichen Allele

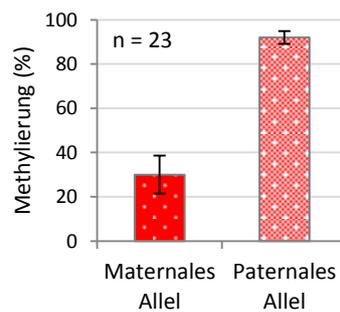
Gen	Gewebe	n	Methylierung maternales Allel (%)				Methylierung paternales Allel (%)			
			Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD
<i>MEG3</i> IG-DMR	FCB	30	16,9	29,6	23,0	2,9	86,7	98,0	92,2	3,0
	AB	23	18,8	59,5	30,0	8,6	84,0	95,4	93,1	2,4
	VAT	13	19,3	52,0	29,5	9,2	84,3	96,0	92,7	3,5
<i>MEST</i>	FCB	50	81,5	98,7	93,3	4,6	5,4	58,5	21,7	12,5
	AB	36	88,7	96,6	93,8	1,8	5,9	50,3	15,1	8,8
	VAT	24	93,4	98,1	95,5	1,1	5,2	22,7	11,1	4,3

FCB: fetal cord blood; AB: adult blood; VAT: visceral adipose tissue; SD: standard deviation; Min: Minimum; Max: Maximum.

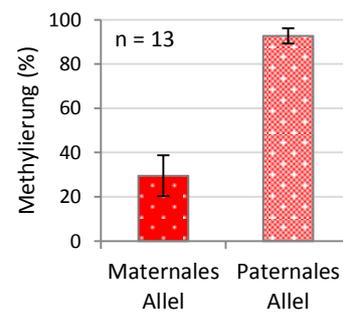
A *MEG3* IG-DMR FCB



B *MEG3* IG-DMR AB



C *MEG3* IG-DMR VAT



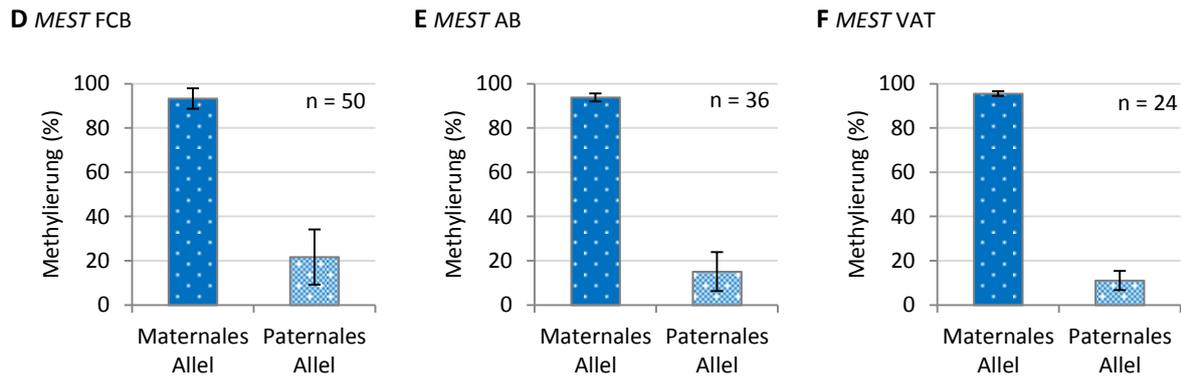


Abbildung 31: Roche GS Junior Methylierung der elterlichen Allele

A-C: *MEG3* IG-DMR; D-F: *MEST*. Analysiertes Gewebe: fetal cord blood (FCB), adult blood (AB) und visceral adipose tissue (VAT). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt. Anhand der Heterozygotie für einen informativen SNP konnten die beiden Allele für eine Probe unterschieden und anhand der Methylierung einem Elternteil zugeordnet werden. Für beide Loci ist die Methylierung des methylierten Allels sehr stabil (92% - 96%), während das unmethylierte Allel eine klare Hypermethylierung in allen untersuchten Geweben aufweist (11% - 30%).

Die probenweise CpG-Methylierung wurde als farbkodierte Heatmaps, unterteilt in die beiden parentalen Allele, dargestellt (siehe Abbildung 32). Das paternale *MEG3*- und das maternale *MEST*-Allel (beide erwartungsgemäß methyliert) zeigten in allen Proben und für alle CpGs eine Methylierung von über 75 %. Für die beiden erwartungsgemäß unmethylierten Allele wurden dagegen viele intermediär methylierte CpGs (25 – 75 %) in nahezu allen Proben festgestellt. Manche CpGs scheinen von aberranten Methylierungsmustern mehr betroffen zu sein als andere, wie beispielsweise das CpG3 für *MEG3* IG-DMR oder CpG22 für *MEST*. Unabhängig von der elterlichen Allel-Herkunft wurde für beide Loci eine Hypermethylierung des unmethylierten Allels (HNA) gemessen. Die erhöhte Methylierung könnte entweder durch ganze Allelmethylierungsfehler (die Mehrheit der CpGs innerhalb eines Allels/Reads sind abnormal methyliert) begründet sein oder durch vereinzelte methylierte CpGs, die sich zufällig über alle oder sehr viele Allele/Reads verteilen.

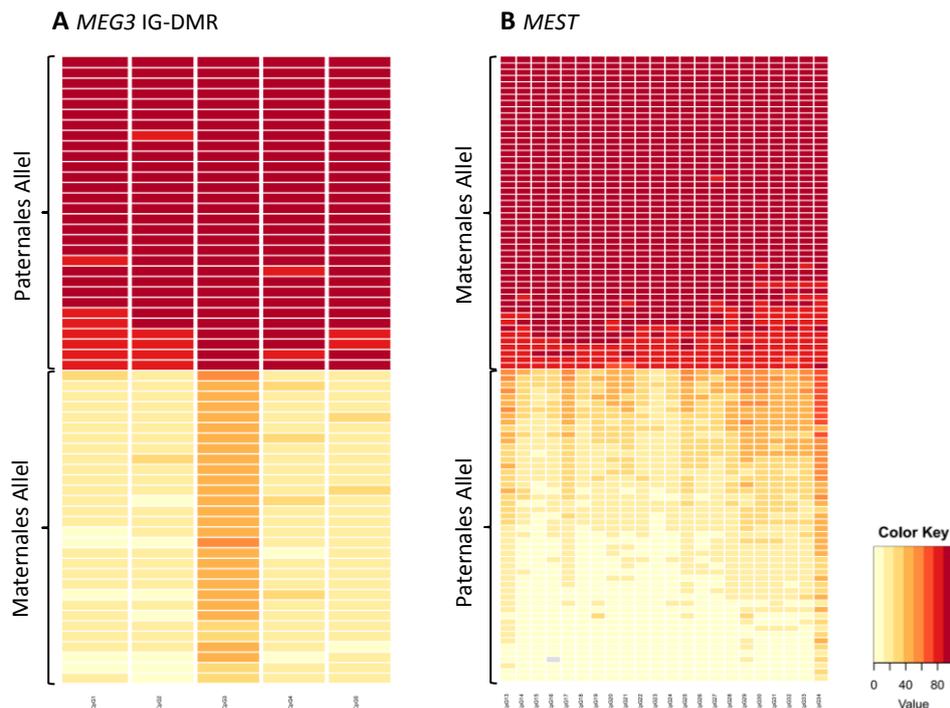


Abbildung 32: Roche GS Junior CpG-Methylierung als Heatmap

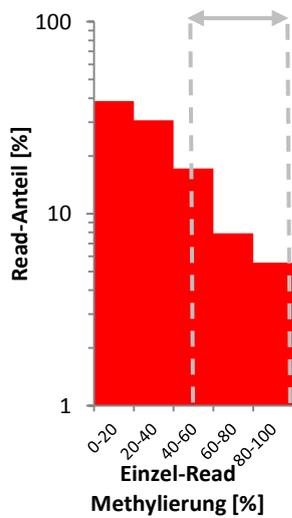
A: *MEG3* IG-DMR; B: *MEST*. Analysiertes Gewebe: fetal cord blood (FCB). Jede Zeile der Heatmaps steht für eine individuelle Probe (IDs), jede Spalte für ein einziges CpG-Dinukleotid (*MEG3* IG-DMR: 5 CpGs, *MEST*: 22 CpGs). Gelbe Kästchen signalisieren einen unmethylierten Status, rote einen methylierten. Mischfarben repräsentieren intermediäre Methylierungslevel. Bei grauen Kästchen war die Read-Coverage zu niedrig, um verlässlich ausgewertet zu werden.

Darüber hinaus wurde die Verteilung der prozentualen Methylierung in individuellen Reads dargestellt (siehe Abbildung 33). Mit fünf CpGs deckt der *MEG3* IG-DMR Assay vergleichsweise wenige CpGs ab, daher wurde die Methylierung in 20 %-Intervallen aufgetragen. Für *MEST* wurden 10 %-Bereiche gewählt, da der Assay insgesamt 22 CpGs umfasste (siehe Tabelle 36). Für das unmethylierte Allel wurden diejenigen Reads als epimutiert klassifiziert, bei denen ≥ 50 % der enthaltenen CpGs methyliert waren, für das methylierte Allel diejenigen, bei denen ≤ 50 % der CpGs methyliert waren. Obwohl die überwiegende Mehrheit der maternalen *MEG3* IG-DMR Reads und der paternalen *MEST* Reads (jeweils das erwartungsgemäß nicht-geprägte Allel) ein unmethyliertes Profil zeigten, waren viele Reads, die das gesamte Methylierungsspektrum von 0 % - 100 % abdeckten, vorhanden. Eine große Anzahl an Reads waren zu ≥ 50 % methyliert (Epimutationen). Für das erwartungsgemäß geprägte Allel waren die meisten Reads vollständig methyliert (80 % - 100 %) und nur eine relativ niedrige Zahl an Reads befanden sich im epimutierten Bereich (0 % - 50 %).

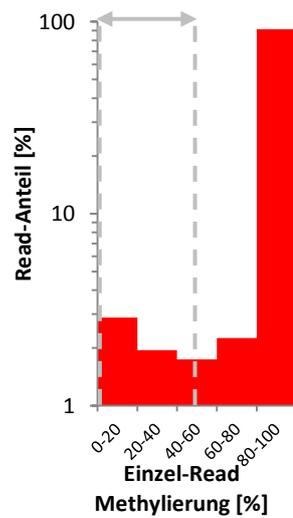
Tabelle 36: Roche GS Junior Verteilung der prozentualen Read-Methylierung

Methylierungs- Intervalle (%)	Gen		Methylierungs- Intervalle (%)	Gen	
	<i>MEG3</i> IG-DMR			<i>MEST</i>	
	Unmethyliertes Allel (%)	Methyliertes Allel (%)		Unmethyliertes Allel (%)	Methyliertes Allel (%)
0-20	38,7	2,9	0-10	62,0	1,8
20-40	30,7	1,9	10-20	8,6	0,4
40-60	17,2	1,7	20-30	5,0	0,5
60-80	7,9	2,2	30-40	3,1	0,3
80-100	5,6	91,2	40-50	2,5	0,4
			50-60	4,0	1,0
			60-70	2,3	0,8
			70-80	3,1	2,4
			80-90	3,3	3,6
			90-100	6,0	88,8

A *MEG3* IG-DMR unmeth



B *MEG3* IG-DMR meth



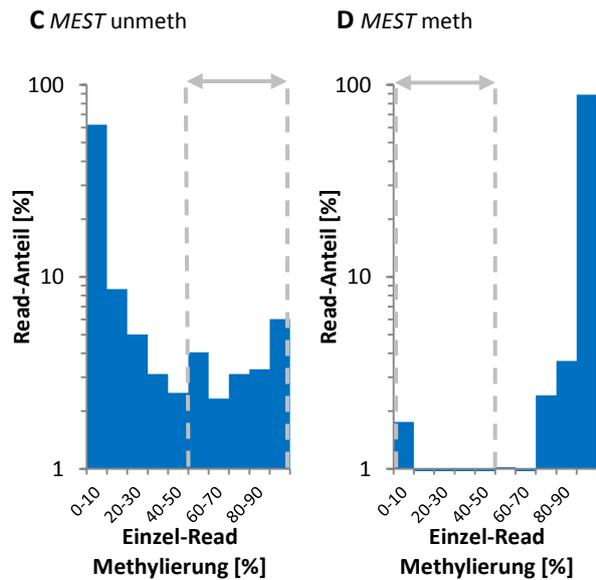


Abbildung 33: Roche GS Junior Verteilung der prozentualen Read-Methylierung

A-B: *MEG3* IG-DMR; C-D: *MEST*. Analysiertes Gewebe: fetal cord blood (FCB). Der Definitionsbereich von Epimutationen ist grau markiert (>50% aberrant (de)methylierte CpGs). Für das nicht-geprägte (unmethylierte) Allel wurde in beiden Genen mehr Epimutationen detektiert als für das geprägte (methylierte) Allel.

Unmethyliertes Allel: *MEG3* IG-DMR maternales Allel, *MEST*: paternales Allel
Methyliertes Allel: *MEG3* IG-DMR paternales Allel, *MEST*: maternales Allel

3.2.1.2 Epimutationsraten

Reads mit $\geq 50\%$ abnormal (de)methylierten CpGs, also einer $\geq 50\%$ aberranten Prägung, wurden als Epimutationen klassifiziert und daraus die Epimutationsrate (ER) berechnet, indem die Anzahl an Epimutationen durch die Gesamtanzahl aller Reads für ein Allel geteilt wurde. Die Epimutationsraten sind in Tabelle 37 und Abbildung 34 zusammengefasst und waren für das normalerweise unmethylierte Allel 3 - 4 Mal höher verglichen mit dem methylierten Allel. Für die *MEG3* IG-DMR reichte die ER in FCB von 4,6 % bis 22,1 %, in AB von 10,0 % bis 65,5 % und in VAT von 7,8 % bis 52,1 %. Die daraus resultierenden Durchschnittswerte waren $13,4 \pm 4,3\%$ (FCB), $23,3 \pm 11,8\%$ (AB) und $22,7 \pm 11,4\%$ (VAT). Für das paternale Allel betragen die ERs im Durchschnitt $6,6 \pm 3,3\%$, $5,2 \pm 2,8\%$ und $6,0 \pm 3,5\%$ in FCB, AB und VAT (Abbildung 34 A-C). Die maternale ER in *MEST* war $3,8 \pm 4,4\%$ in FCB, $3,3 \pm 1,7\%$ in AB und $2,1 \pm 0,8\%$ in VAT. Das paternale Allel zeigte dagegen deutlich höhere ERs mit $18,5 \pm 14,3\%$ in FCB (von 2,1 % bis 61,5 %) mit $12,4 \pm 10,3\%$ in AB (von 2,3 % bis 57,6 %) und mit $7,5 \pm 4,5\%$ in VAT (von 1,9 % bis 19,8 %) (Abbildung 34 D-F). In beiden Genen und allen Geweben war die ER des unmethylierten Allels signifikant höher als die ER des methylierten Allels ($p < 0,001$, MWU/t-Test).

Tabelle 37: Roche GS Junior Epimutationsraten der beiden elterlichen Allele

Gen	Gewebe	n	ER maternales Allel (%)				ER paternales Allel (%)			
			Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD
<i>MEG3</i> IG-DMR	FCB	30	4,6	22,1	13,4	4,3	1,1	12,8	6,6	3,3
	AB	23	10,0	65,5	23,3	11,8	1,9	15,2	5,2	2,8
	VAT	13	7,8	52,1	22,7	11,4	2,8	14,7	6,0	3,5
<i>MEST</i>	FCB	50	0,0	15,4	3,8	4,4	2,1	61,5	18,5	14,3
	AB	36	1,4	9,1	3,3	1,7	2,3	57,6	12,4	10,3
	VAT	24	0,3	3,6	2,1	0,8	1,9	19,8	7,5	4,5

FCB: fetal cord blood; AB: adult blood; VAT: visceral adipose tissue; SD: standard deviation; Min: Minimum; Max: Maximum; ER: Epimutationsrate.

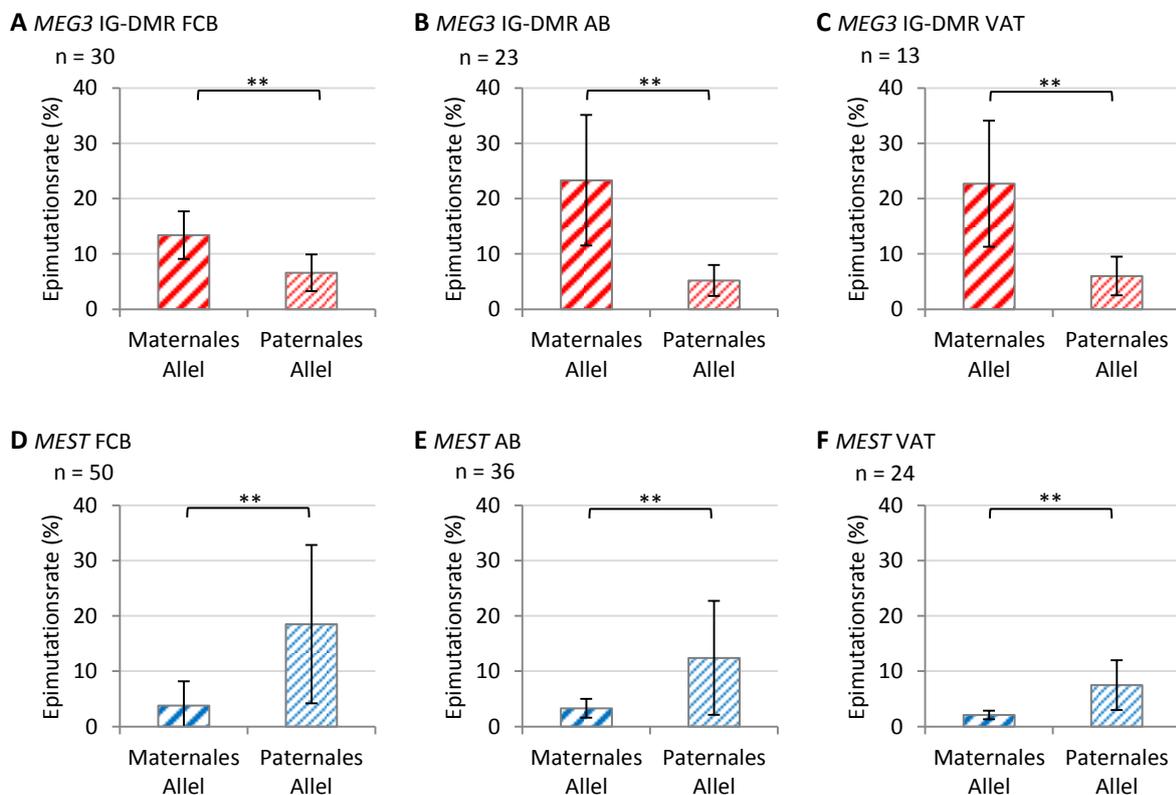


Abbildung 34: Roche GS Junior Epimutationsrate der elterlichen Allele

A-C: *MEG3* IG-DMR; D-F: *MEST*. Analysiertes Gewebe: fetal cord blood (FCB), adult blood (AB) und visceral adipose tissue (VAT). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt. In beiden analysierten Genen ist die Epimutationsrate des unmethylierten Allels signifikant höher als die Epimutationsrate des methylierten Allels. Das Signifikanzniveau entsprach * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Unmethyliertes Allel: *MEG3* IG-DMR maternales Allel, *MEST*: paternales Allel

Methyliertes Allel: *MEG3* IG-DMR paternales Allel, *MEST*: maternales Allel

Die interindividuelle Variation der parentalen Epimutationsrate ist in Abbildung 35 aufgeführt. Dabei sind die beiden ERs einer Probe über eine Linie miteinander verbunden dargestellt. Die Varianz zwischen Individuen ist beachtenswert. Dennoch ist auch hier deutlich erkennbar, dass die ERs des unmethylierten maternalen *MEG3* IG-DMR Allels und des paternalen *MEST* Allels durchweg höher waren, als die ERs des methylierten Allels. Nur für den *MEST* Promotor wurden wenige Ausreißer beobachtet. In einzelnen Proben bewegte sich die ER für das methylierte Allel von 0 % - 15 % und für das unmethylierte Allel von 2 % - 66 % (siehe Tabelle 37).

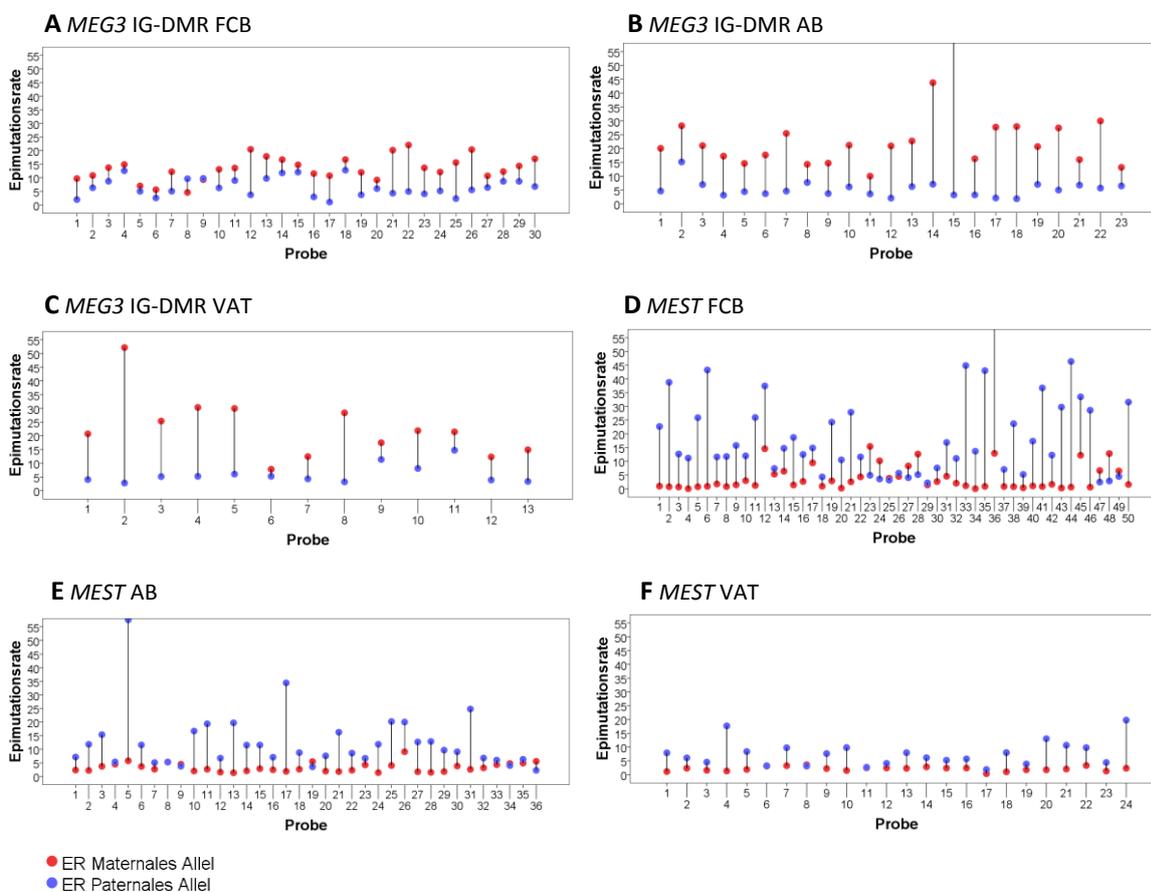


Abbildung 35: Roche GS Junior interindividuelle Variation der parentalen ER

A-C: *MEG3* IG-DMR; D-F: *MEST*. Analysiertes Gewebe: fetal cord blood (FCB), adult blood (AB) und visceral adipose tissue (VAT). Für jede Probe ist die Epimutationsrate des maternalen Allels (roter Punkt) mit der Epimutationsrate des paternalen Allels (blauer Punkt) über eine Linie verbunden. Für beiden Loci sind die Epimutationsraten des unmethylierten Allels deutlich erhöht und zeigen eine starke interindividuelle Varianz.

3.2.1.3 Vergleich zwischen somatischem Gewebe und Keimzellen

Nach heutigem Wissensstand erwartet man, dass primäre DMRs geprägter Gene ihr in der Keimbahn etabliertes Methylierungsmuster auch nach der Differenzierung in somatisches Gewebe beibehalten. Um einen Gewebevergleich zwischen somatischem Gewebe und Gameten anstellen zu können, wurden zusätzlich auch Spermien als Referenz für das paternale Allel analysiert. Aufgrund der schlechteren Zugänglichkeit konnten in diesem Versuch leider keine Oozyten (als Referenz für das maternale Allel) untersucht werden. Um die Methylierung und die Epimutationsraten zwischen somatischem Gewebe und Keimzellen vergleichen zu können, wurde auch für die drei somatischen Gewebe somit nur das paternale Allel herangezogen (siehe Tabelle 38). Für *MEG3* IG-DMR betrug die Spermienmethylierung $94,7 \pm 1,9$ %, für *MEST* $2,4 \pm 2,3$ %. Die Durchschnittsmethylierung variierte insgesamt nur um 2,5 % zwischen den verschiedenen Geweben für den *MEG3* IG-DMR Locus, jedoch bis zu 19,3 % für den *MEST* Promotor (siehe Abbildung 36 A und B). Die Spermien-ER war $0,9 \pm 1,6$ % und $0,5 \pm 1,4$ % für die *MEG3* IG DMR bzw. *MEST*. Die ERs aller somatischen Gewebe waren signifikant höher (siehe Abbildung 36 und Tabelle 39). Daraus kann geschlossen werden, dass die maternale und paternale Prägung in Keimzellen (zumindest in Spermien) strenger kontrolliert wird als in somatischen Zellen. Für reife menschliche Eizellen sind Studien bekannt, die auf Einzel-Molekül Level Epimutationsraten um 3 % gefunden haben [247, 248]. Damit scheint auch die weibliche Keimbahn deutlich strikter reguliert zu sein, verglichen mit 13 % - 23 % Methylierung (maternales Allel) der hier untersuchten somatischen Geweben.

Tabelle 38: Roche GS Junior paternale Methylierung und Epimutationsrate

Gen	Gewebe	n	Methylierung paternales Allele (%)				Epimutationsrate paternales Allele (%)			
			Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD
<i>MEG3</i> IG-DMR	Spermien	54	90,9	99,8	94,7	1,9	0,0	9,7	0,9	1,6
	FCB	30	86,7	98,0	92,2	3,0	1,1	12,8	6,6	3,3
	AB	23	84,0	95,4	93,1	2,4	1,9	15,2	4,8	2,8
	VAT	13	84,3	96,0	92,7	3,5	2,8	14,7	6,0	3,5
<i>MEST</i>	Spermien	51	0,4	11,6	2,4	2,3	0,0	7,3	0,5	1,4
	FCB	50	5,4	58,5	21,7	12,5	2,1	61,5	18,5	14,3
	AB	36	5,9	50,3	15,1	8,8	2,3	57,6	12,4	10,3
	VAT	24	5,2	22,7	11,1	4,3	1,9	19,8	7,5	4,5

FCB: fetal cord blood; AB: adult blood; VAT: visceral adipose tissue; SD: standard deviation.

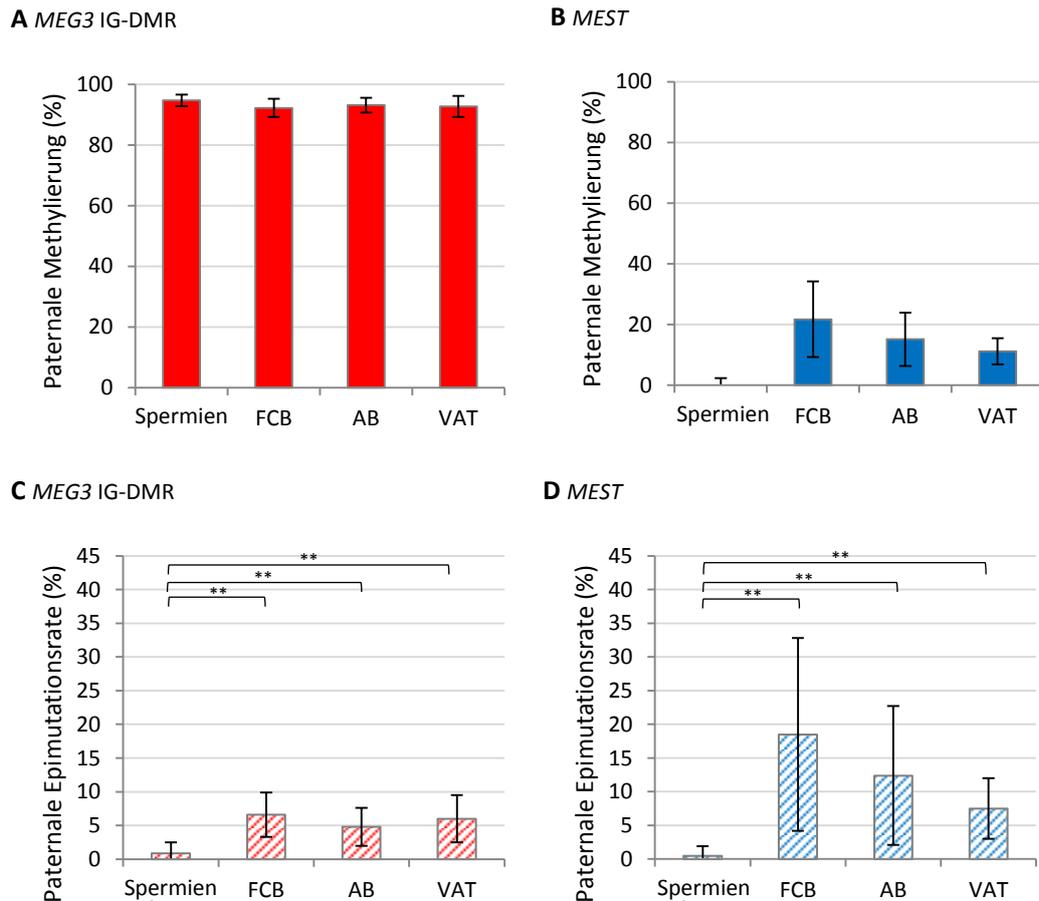


Abbildung 36: Roche GS Junior paternale Methylierung und Epimutationsrate

A&C: *MEG3* IG-DMR; B&D: *MEST*. Analysiertes Gewebe: fetal cord blood (FCB), adult blood (AB), visceral adipose tissue (VAT) und Spermien. Für *MEG3* IG-DMR entspricht das paternale Allel dem methylierten Allel. Die Methylierungswerte sind stabil für alle untersuchten Gewebe (93-95%) (A). In *MEST* ist das paternale Allel das erwartungsgemäß unmethylierte Allel. Das paternale Allel variiert hier stark zwischen den verschiedenen Geweben (2%-22%) (B). Für beide Loci war wie Epimutationsrate in den Spermien signifikant niedriger als in den somatischen Geweben (C/D). Andere signifikante Vergleiche sind nicht in die Abbildung eingezeichnet und können Tabelle 39 entnommen werden. Das Signifikanzniveau entsprach $**p < 0,001$, $*p < 0,05$.

Tabelle 39: p-Werte für die Methylierung und ER des paternalen Allels

Gewebe-Vergleich	Methylierung paternales Allel		Epimutationsrate paternales Allel	
	<i>MEG3</i> IG-DMR	<i>MEST</i>	<i>MEG3</i> IG-DMR	<i>MEST</i>
Spermien vs. FCB	$p < 0,001$ (t-Test)	$p < 0,001$ (MWU)	$p < 0,001$ (t-Test)	$p < 0,001$ (MWU)
Spermien vs. AB	$p = 0,005$ (MWU)	$p < 0,001$ (MWU)	$p < 0,001$ (MWU)	$p < 0,001$ (MWU)
Spermien vs. VAT	$p = 0,057$ (MWU)	$p < 0,001$ (MWU)	$p < 0,001$ (MWU)	$p < 0,001$ (MWU)
FCB vs. AB	$p = 0,229$ (MWU)	$p = 0,010$ (MWU)	$p = 0,118$ (MWU)	$p = 0,074$ (MWU)
FCB vs. VAT	$p = 0,366$ (MWU)	$p < 0,001$ (MWU)	$p = 0,425$ (MWU)	$p < 0,001$ (MWU)
AB vs. VAT	$p = 0,745$ (MWU)	$p = 0,049$ (MWU)	$p = 0,770$ (MWU)	$p = 0,025$ (MWU)

FCB: fetal cord blood; AB: adult blood; VAT: visceral adipose tissue; SD: standard deviation; MWU: Mann-Whitney U. Signifikante CpGs sind in schwarzer Schrift dargestellt, nicht signifikante CpGs in grauer Schrift.

Sowohl die ER als auch die Methylierung zeigte signifikante Gruppenunterschiede zwischen Spermien und somatischen Geweben (einzige Ausnahme: Methylierung Spermien vs. VAT).

3.2.1.4 Expression

Um zu überprüfen, ob sich die HNA regulatorisch auf das Expressionsniveau der untersuchten Gene auswirkt, wurden RT-qPCRs angefertigt. Da aus fetalem bzw. adultem Blut keine intakte RNA mehr gewonnen werden konnte, wurden dafür VAT Proben herangezogen, für die DBS-Methylierungsdaten verfügbar waren (Roche GS Junior). Für *MEST* wurden insgesamt 20 Proben analysiert, für *MEG3* waren es 7 (Abbildung 37). Die Expressionsdaten sind als $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte mit $\Delta\text{Ct SE}$ dargestellt (Triplikat-Messung). Als Referenzgene dienten *HPRT*, *IPO8*, *RPLP0* und *GAPDH*. Bei der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode werden die Ct-Werte von Referenzgenen und Zielgenen voneinander abgezogen (ΔCt -Wert) und dann auf eine (Kontroll)-Probe normalisiert. Der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert gibt damit die normalisierte n-fache Expression im Vergleich zu dieser Probe an. Für die Normalisierung wurden diejenigen Proben herangezogen, die die geringste Differenz der beiden Epimutationsraten gezeigt hatten (ER nicht geprägtes Allel minus ER geprägtes Allel). Bei *MEST* war das die Probe VAT 8, bei *MEG3* VAT 6 (siehe Tabelle 48 und Abbildung 37). Die beiden *MEST* Assays korrelierten dabei stark miteinander ($R = 0,980$; $p \leq 0.001$), zeigten jedoch eine hohe Variabilität zwischen den Proben. Entgegen der Erwartung zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der ER-Differenz und der Expression für Assay 1 ($R = 0,489$; $p = 0,029$) und Assay 2 ($R = 0,529$; $p = 0,016$). Das *MEST*-Expressionslevel korrelierten außerdem mit dem BMI ($R = 0,445$; $p = 0,049$ für Assay 2). Für *MEG3* waren die ER-Differenz (IG-DMR) und die Expression invers miteinander korreliert. Aufgrund einer zu niedrigen Probenzahl konnte jedoch keine Signifikanz erreicht werden ($R = -0,413$; $p = 0,357$).

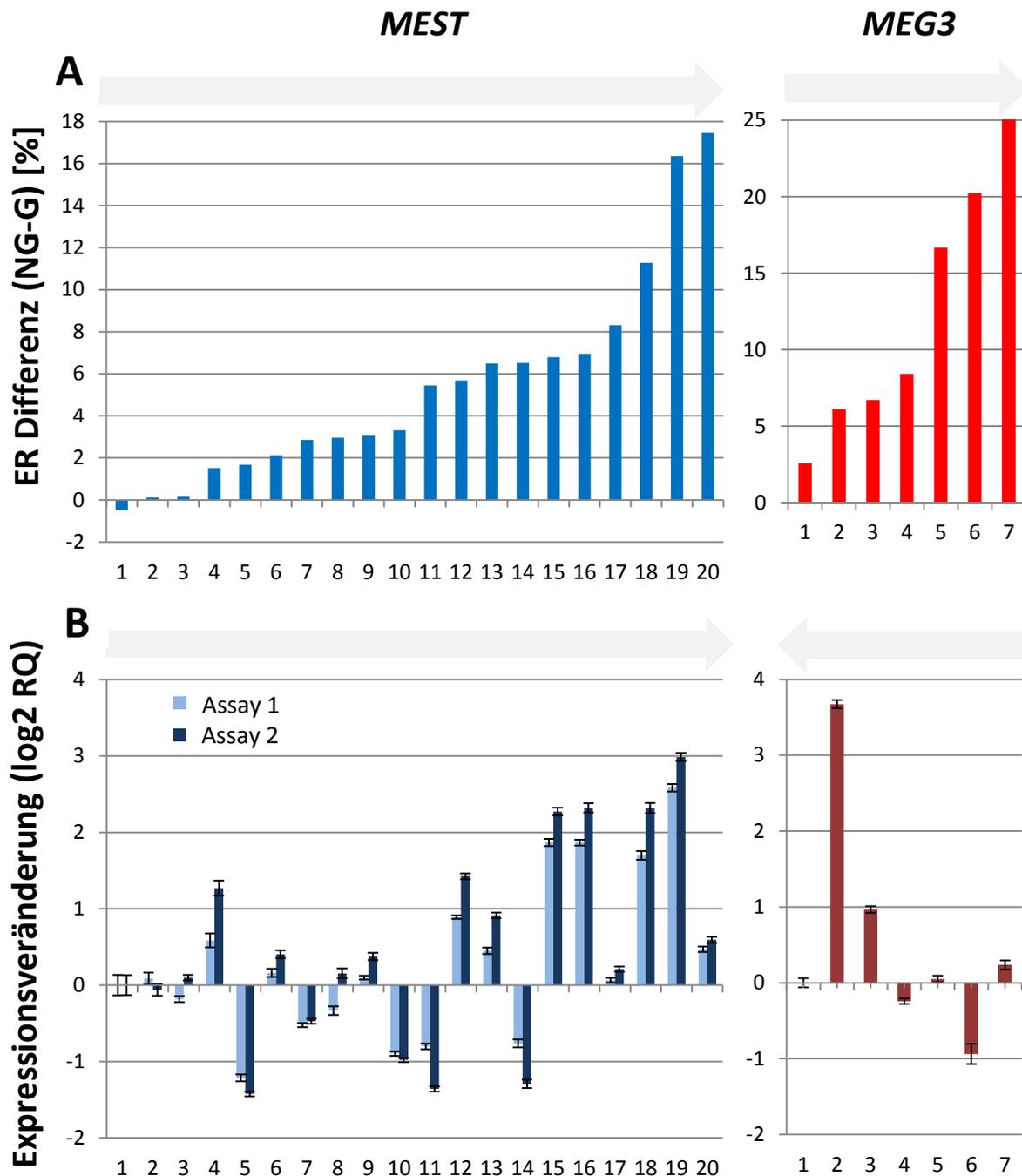


Abbildung 37: Verhältnis der Methylierung und der Genexpression in VAT Proben

(A) Die Hypermethylierung des *MEST* Promotors und der *MEG3* IG-DMR der Viszeralfett-Proben ist als ER-Differenz angegeben (Epimutationsrate des nicht geprägten Allels minus Epimutationsrate des geprägten Allels) und gibt den Anteil der Zellen mit bialellischer Methylierung wider. Die Proben 1 bis 20 (*MEST*) bzw. 1 bis 7 (*MEG3*) wurden von der niedrigsten bis zur höchsten Methylierung aufsteigend sortiert. (B) Die unteren Graphen geben das Expressionsniveau derselben Proben wieder. Für die Auswertung wurde die $\Delta\Delta Ct$ Methode angewandt. Dabei wurde jeweils auf die Probe mit der niedrigsten ER-Differenz (*MEST*: VAT 8, *MEG3*: VAT 6; siehe Tabelle 48) normalisiert. Ein \log_2 RQ Wert von +1 gibt eine Verdopplung, -1 eine Halbierung der Expression im Vergleich zur Probe 1 an.

Ct: cycle threshold; ER: Epimutationsrate; G: geprägt; NG: nicht geprägt; RQ: relative Quantifizierung; SE: Standardfehler; VAT: visceral adipose tissue.

3.2.2 DBS mit dem Illumina MiSeq

Die DBS Technologie wurde auf die Illumina MiSeq Plattform überführt, um die Sequenzierungspower zu erhöhen (Sequenzierungstiefe, gleichzeitige Analyse mehrerer Amplikons) und um die Methylierungseffekte mit einer zweiten unabhängigen Methode zu validieren. Mit dem Illumina MiSeq wurden FCB-Proben für die vier Loci *MEG3* IG-DMR ($n = 45$), *MEG3* Promotor ($n = 31$), *MEST* ($n = 58$) und *PEG3* ($n = 21$) untersucht. Abhängig vom Assay variierte die durchschnittliche Readzahl und die SNP-Ratio von 13.116 ± 6.593 und $0,58 \pm 0,21$ für den *MEG3* Promotor bis 46.836 ± 28.743 und $0,71 \pm 0,12$ für die *MEG3* IG-DMR (siehe Tabelle 40). Im Vergleich zu den Roche GS Junior Daten war die Read-Coverage pro Probe mit dem Illumina MiSeq 10 – 45 Mal höher.

Tabelle 40: Illumina MiSeq Run-Parameter

Gen	Gewebe	n	Reads (Mittelwert \pm SD)	SNP Ratio (Mittelwert \pm SD)
<i>MEG3</i> IG-DMR	FCB	45	46.836 ± 28.743	$0,71 \pm 0,12$
<i>MEG3</i> Promotor	FCB	31	13.116 ± 6.593	$0,58 \pm 0,21$
<i>MEST</i>	FCB	58	19.928 ± 19.771	$0,71 \pm 0,15$
<i>PEG3</i>	FCB	21	42.429 ± 17.053	$0,60 \pm 0,13$

FCB: fetal cord blood; AB: adult blood; VAT: visceral adipose tissue; SD: standard deviation.

Der Mittelwert der Proben ohne Unterscheidung der parentalen Allel-Herkunft betrug $52,0 \pm 4,2$ % für *MEG3* IG-DMR, $64,3 \pm 8,1$ % für *MEG3* Promoter, $52,8 \pm 6,5$ % für *MEST*, $62,4 \pm 4,1$ % für *PEG3* und kann Tabelle 41 und Abbildung 38 entnommen werden. Auch hier zeigte sich eine leichte Hypermethylierung gemessen an den hypothetischen 50 %, die man für geprägte Gene erwarten würde.

Tabelle 41: Illumina MiSeq Methylierung ohne Allel-Unterscheidung

Gen	Gewebe	n	Methylierung (%)			
			Min	Max	Mittelwert	SD
<i>MEG3</i> IG-DMR	FCB	45	39,8	64,3	52,0	4,2
<i>MEG3</i> Promotor	FCB	31	47,5	76,4	64,3	8,1
<i>MEST</i>	FCB	58	35,5	66,0	52,8	6,5
<i>PEG3</i>	FCB	21	54,2	68,5	62,4	4,1

FCB: fetal cord blood; SD: standard deviation; Min: Minimum; Max: Maximum.

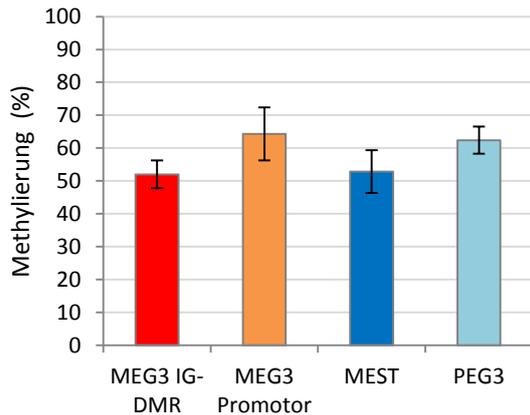


Abbildung 38: Illumina MiSeq Methylierung ohne Allel Unterscheidung

Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Das Signifikanzniveau entsprach * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Wie die primäre *MEG3* IG-DMR so ist auch die sekundäre *MEG3* Promotor DMR paternal geprägt. Übereinstimmend mit den Roche GS Junior Daten zeigte das paternale *MEG3* IG-DMR Allel eine Methylierung von $95,5 \pm 2,2$ % und das maternale Allele eine Methylierung von $21,1 \pm 3,1$ % (vergleiche Tabelle 42 und Tabelle 35). Die maternale bzw. paternale Allel-Methylierung der *MEG3* Promotor DMR betrug $94,8 \pm 1,4$ % und $9,0 \pm 10,6$ %. Daraus kann geschlossen werden, dass der demethylierte Zustand des maternalen Allels für die Promotor DMR besser aufrechterhalten und wahrscheinlich strikter reguliert wird, als für die IG-DMR. *MEST* und *PEG3* sind beides mütterlich geprägte Gene und zeigten als solche $95,7 \pm 3,1$ % und $95,6 \pm 1,8$ % Methylierung für das methylierte maternale Allel und $22,3 \pm 9,4$ % bzw. $6,3 \pm 4,7$ % für das unmethylierte paternale Allel (siehe Abbildung 39 C & D). Folglich konnte auch für *MEST* die Hypermethylierung des paternalen Allels bestätigt werden.

Tabelle 42: Illumina MiSeq Methylierung der beiden elterlichen Allele

Gen	Gewebe	n	Methylierung des maternalen Allels (%)				Methylierung des paternalen Allels (%)			
			Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD
<i>MEG3</i> IG-DMR	FCB	45	13,4	28,2	21,1	3,1	87,9	98,1	95,5	2,2
<i>MEG3</i> Promotor	FCB	31	1,9	54,8	9,0	10,6	91,8	97,2	94,8	1,4
<i>MEST</i>	FCB	58	82,1	98,9	95,7	3,1	5,6	42,1	22,3	9,4
<i>PEG3</i>	FCB	21	91,4	98,1	95,6	1,8	2,5	19,4	6,3	4,7

FCB: fetal cord blood; SD: standard deviation; Min: Minimum; Max: Maximum.

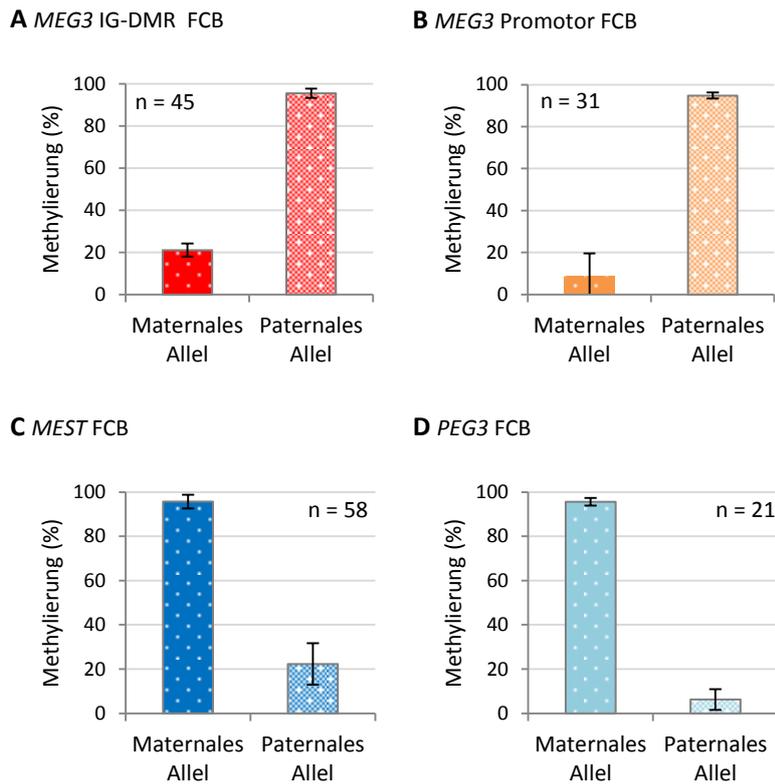
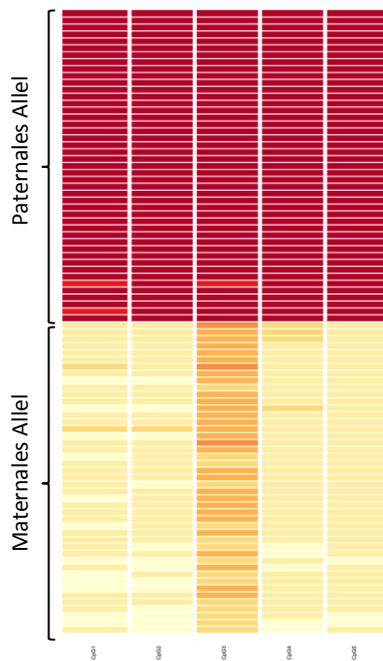
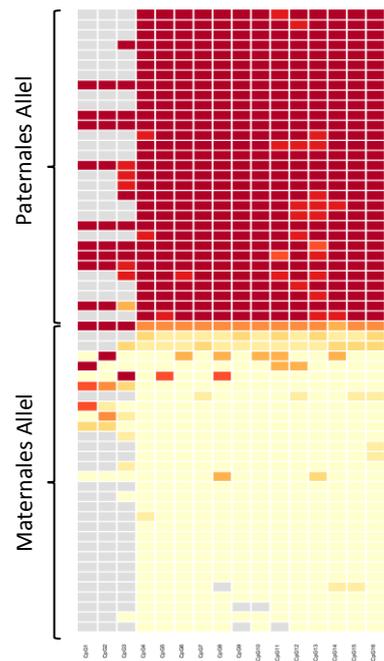
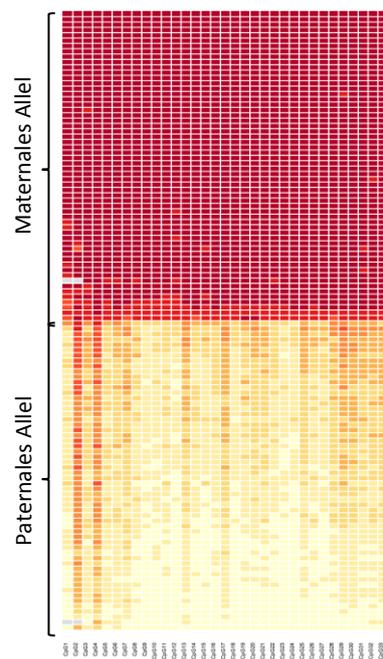
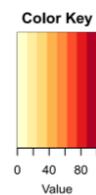
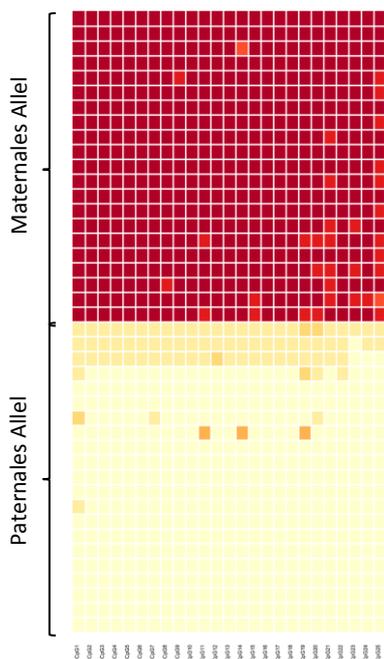


Abbildung 39: Illumina MiSeq Methylierung der elterlichen Allele

A: *MEG3* IG-DMR; B: *MEG3* Promotor; C: *MEST*; D: *PEG3*. Analysiertes Gewebe: fetal cord blood (FCB). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt. Das methylierte Allel ist in allen Genen stabil (95 % - 96 %), genau wie das unmethylierte Allel für *MEG3* Promotor und *PEG3* (6 – 9 %), für *MEG3* IG-DMR und *MEST* zeigte sich jedoch eine unerwartet hohe Methylierung des unmethylierten Allels mit über 20 %.

Die maternale bzw. paternale Einzel-CpG Methylierung pro Probe ist in Abbildung 40 dargestellt. Obwohl andere Primer verwendet wurden und sich die Assays unterschieden, wurden dieselben fünf CpGs mit dem Illumina MiSeq als auch dem Roche GS Junior für die *MEG3* IG-DMR untersucht. Die gemessene Hypermethylierung des nicht-geprägten mütterlichen Allels war mit beiden Technologien vergleichbar hoch, insbesondere CpG3 fiel durch hohe Methylierungswerte auf. Für *MEST* überlappten insgesamt 22 CpGs zwischen den beiden verwendeten Assays (Roche GS Junior: CpG13 - 34; Illumina MiSeq: CpG1 - 33). Auch hier zeigten sich vergleichbare Methylierungsmuster spezifischer CpG-Dinukleotide. Für die *MEG3* Promotor DMR sowie *PEG3* wurde mit dem Illumina MiSeq ein allelspezifisches Prägungsprofil gemessen (siehe Abbildung 40 B & D), das näher an den Erwartungen lag.

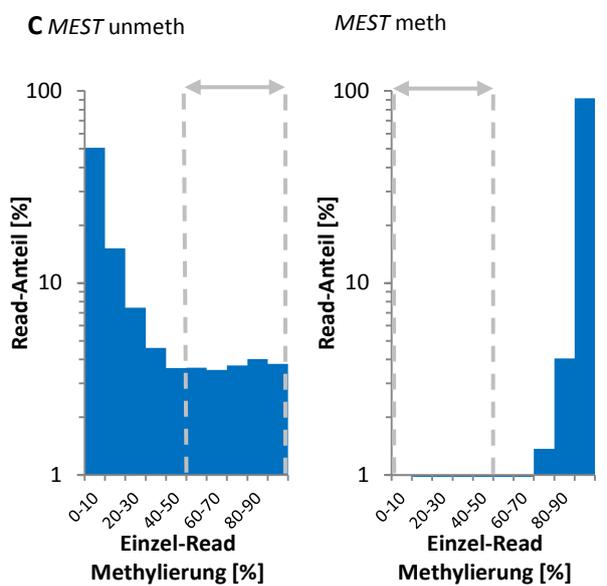
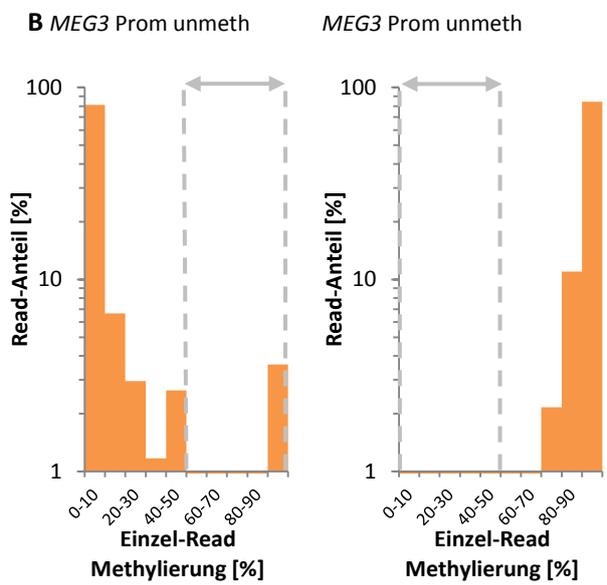
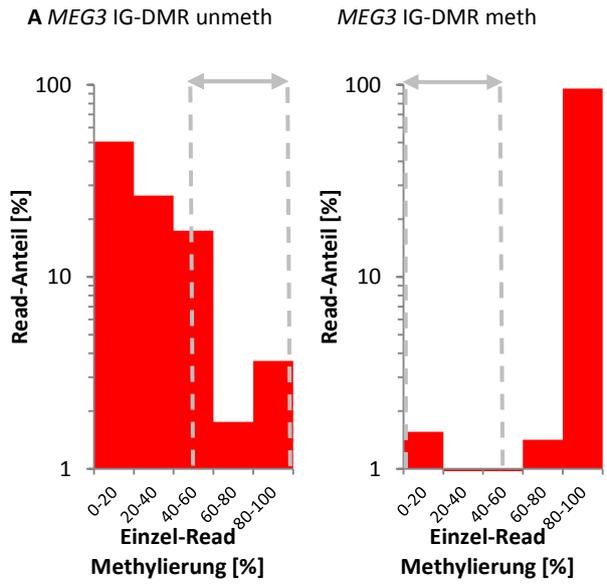
A *MEG3* IG-DMR**B** *MEG3* Promotor**C** *MEST***D** *PEG3***Abbildung 40: Illumina MiSeq CpG-Methylierung als Heatmap**

A: *MEG3* IG-DMR; B: *MEG3* Promotor; C: *MEST*; D: *PEG3*. Analysiertes Gewebe: fetal cord blood (FCB). Jede Zeile steht für eine individuelle Probe (IDs), jede Spalte für ein einziges CpG-Dinukleotid (*MEG3* IG-DMR: 5 CpGs, *MEG3* Promoter: 17 CpGs, *MEST*: 33 CpGs, *PEG3*: 26 CpGs). Gelbe Kästchen signalisieren einen unmethylierten Status, rote einen methylierten. Bei grauen Kästchen war die Read-Coverage zu niedrig, um verlässlich ausgewertet zu werden. In allen Amplikons wurden mehr abnormal hoch methylierte CpGs für das unmethylierte Allel gemessen als abnormal niedrig methylierte CpGs für das methylierte Allel. Dieser Effekt trat besonders für *MEG3* IG-DMR und *MEST* auf, für *MEG3* Promotor und *PEG3* wurde ein klassisches Prägungsmuster detektiert.

Die Verteilung der prozentualen Methylierung in individuellen Reads (Allelen) ist in Abbildung 41 abgebildet. Die Histogramme für *MEG3* IG-DMR und *MEST* waren für beide NGS Plattformen optisch sehr ähnlich (vergleiche Abbildung 41 mit Abbildung 33). Für das geprägte Allel wurden nur wenige Epimutationen detektiert und die meisten Reads befanden sich im 70 – 100 % Bereich, während für das nicht-geprägte Allel vergleichsweise viele hypermethylierte Allele festgestellt wurden, die über das gesamte Methylierungsspektrum reichten. Für die *MEG3* Promotor DMR und *PEG3* war die Anzahl an hypermethylierten Reads deutlich niedriger und für das geprägte Allel wurden gar keine Epimutationen festgestellt.

Tabelle 43: Illumina MiSeq Verteilung der prozentualen Read-Methylierung

Meth- Intervalle (%)	Gen		Meth- Intervalle (%)	Gen					
	<i>MEG3</i> IG-DMR			<i>MEST</i>		<i>MEG3</i> Promotor		<i>PEG3</i>	
	Unmeth Allel (%)	Meth Allel (%)		Unmeth Allel (%)	Meth Allel (%)	Unmeth Allel (%)	Meth Allel (%)	Unmeth Allel (%)	Meth Allel (%)
0-20	50,7	1,6	0-10	50,6	1,0	81,0	0,2	86,4	0,8
20-40	26,5	0,8	10-20	15,2	0,3	6,7	0,1	8,1	0,1
40-60	17,4	0,8	20-30	7,4	0,2	3,0	0,1	1,2	0,2
60-80	1,8	1,4	30-40	4,6	0,1	1,2	0,1	0,4	0,1
80-100	3,6	95,4	40-50	3,6	0,2	2,6	0,4	0,4	0,1
			50-60	3,6	0,4	0,7	0,8	0,2	0,5
			60-70	3,5	0,8	0,3	0,8	0,1	0,7
			70-80	3,7	1,4	0,3	2,2	0,1	1,1
			80-90	4,0	4,0	0,6	11,0	0,2	5,1
			90-100	3,8	91,6	3,6	84,4	2,8	91,3



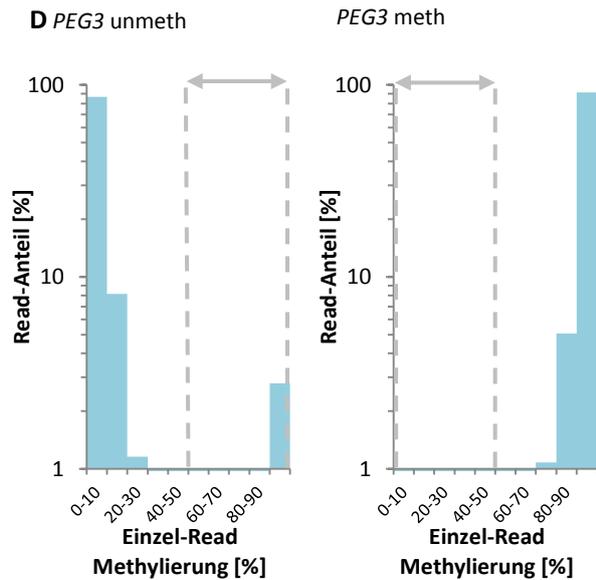


Abbildung 41: Illumina MiSeq Verteilung der prozentualen Read-Methylierung

A: *MEG3* IG-DMR; B: *MEG3* Promotor; C: *MEST*; D: *PEG3*. Analysiertes Gewebe: fetal cord blood (FCB). Der Definitionsbereich von Epimutationen ist grau markiert (>50% aberrant (de)methylierte CpGs). Für das nicht-geprägte (unmethylierte) Allel wurden in allen vier Genen mehr Epimutationen detektiert als für das geprägte (methylierte) Allel, besonders auffällig waren *MEG3* IG-DMR und *MEST*.

Unmethyliertes Allel: *MEG3* IG-DMR maternales Allel, *MEG3* Promotor maternales Allel, *MEST*: paternales Allel, *PEG3* paternales Allel

Methyliertes Allel: *MEG3* IG-DMR paternales Allel, *MEG3* Promotor paternales Allel, *MEST*: maternales Allel, *PEG3* maternales Allel

Für die drei Loci *MEG3* IG-DMR, *MEG3* Promotor und *MEST* waren die Epimutationsraten des erwartungsgemäß unmethylierten nicht-geprägten Allels signifikant höher ($p < 0,001$, MWU) als für das erwartungsgemäß methylierte geprägte Allel (siehe Tabelle 44 und Abbildung 42). Auch für *PEG3* war die ER des nicht-geprägten Allels ($3,4 \pm 5,1$ %) höher als die des geprägten Allels ($1,5 \pm 1,7$ %), allerdings nicht signifikant ($p = 0,443$, MWU).

Tabelle 44: Illumina MiSeq Epimutationsraten der beiden elterlichen Allele

Gen	Gewebe	n	ER maternales Allel (%)				ER paternales Allel (%)			
			Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD
<i>MEG3</i> IG-DMR	FCB	45	4,9	25,9	13,6	4,4	0,9	11,3	3,1	2,4
<i>MEG3</i> Promotor	FCB	31	0,3	54,5	5,6	10,5	0,1	3,9	1,0	1,0
<i>MEST</i>	FCB	58	0,2	13,6	1,8	2,9	0,7	41,8	18,6	10,9
<i>PEG3</i>	FCB	21	0,2	6,2	1,5	1,7	0,3	17,3	3,4	5,1

FCB: fetal cord blood; SD: standard deviation; Min: Minimum; Max: Maximum ER: Epimutationsrate.

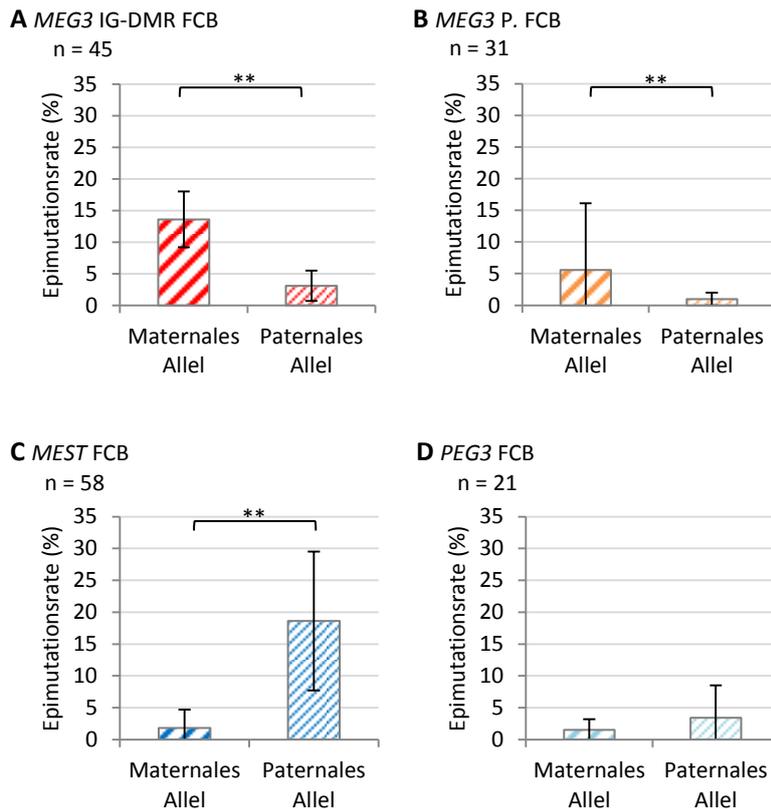


Abbildung 42: Illumina MiSeq Epimutationsrate der elterlichen Allele

A: *MEG3* IG-DMR; B: *MEG3* Promotor; C: *MEST*; D: *PEG3*. Analysiertes Gewebe: fetal cord blood (FCB). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt. Für *MEG3* IG-DMR, *MEG3* Promotor und *MEST* ist die ER des unmethylierten Allels signifikant höher als die ER des methylierten Allels. Für *PEG3* war die Differenz in den ER der beiden parental Allele nicht signifikant. Das Signifikanzniveau entsprach * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Unmethyliertes Allel: *MEG3* IG-DMR maternales Allel, *MEG3* Promotor maternales Allel, *MEST*: paternales Allel, *PEG3* paternales Allel

Methyliertes Allel: *MEG3* IG-DMR paternales Allel, *MEG3* Promotor paternales Allel, *MEST*: maternales Allel, *PEG3* maternales Allel

Es zeigte sich eine starke interindividuelle Varianz der Epimutationsrate des unmethylierten nicht-geprägten Allels für *MEG3* IG-DMR und *MEST* (siehe Abbildung 43). Für den *MEST* Locus war die ER des paternalen Allels durchweg höher als die ER des maternalen Allels, für *MEG3* IG-DMR die ER des maternalen Allels. Innerhalb des *PEG3* und *MEG3* Promotors wiesen die meisten Proben keine großen Unterschiede der ERs der beiden elterlichen Allele auf. Die einzigen Ausnahmen waren Probe 10, 11 und 30 für den *MEG3* Promotor und Probe 8, 12, 15 und 21 für *PEG3*.

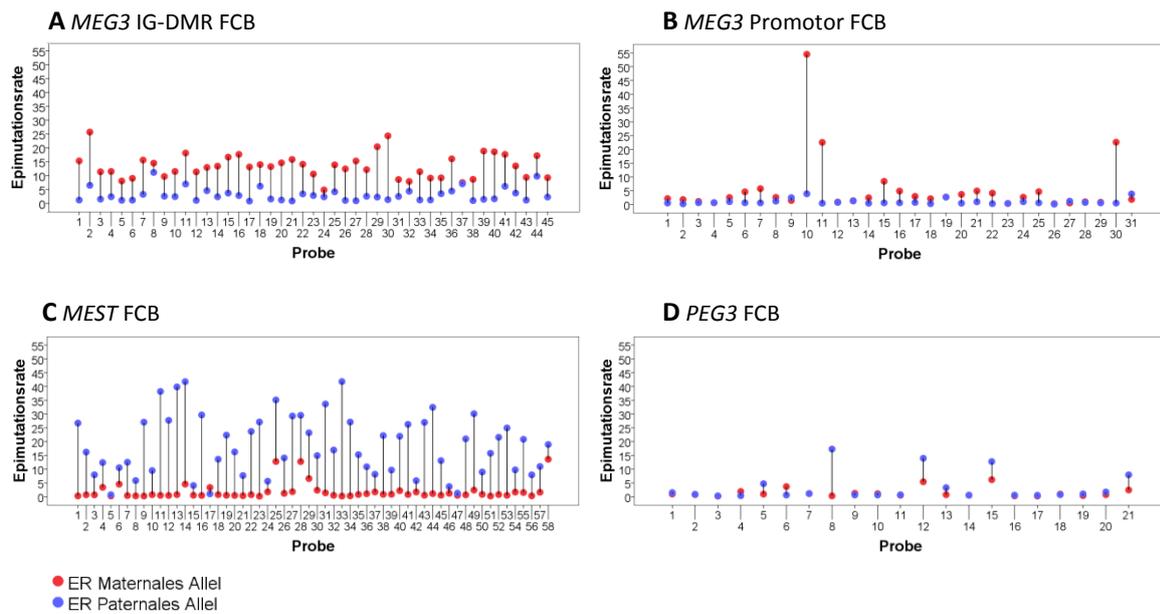


Abbildung 43: Illumina MiSeq interindividuelle Variation der parentalen ER

A: *MEG3* IG-DMR; B: *MEG3* Promotor, C: *MEST*, D: *PEG3*. Analysiertes Gewebe: FCB. Für jede Probe ist die Epimutationsrate (ER) des maternalen Allels (roter Punkt) mit der Epimutationsrate des paternalen Allels (blauer Punkt) über eine Linie verbunden. Für *MEG3* Promotor und *PEG3* unterscheiden sich die ERs der elterlichen Allele für die meisten Proben nur geringfügig. *MEST* und *MEG3* IG-DMR sind dagegen durch eine insgesamt höhere ER des unmethylierten Allels charakterisiert, das außerdem eine starke interindividuelle Varianz aufweist (0 % - 45 %).

In Abbildung 44 sind die Epimutationsraten für die beiden mütterlich exprimierten Loci *MEG3* IG-DMR und *MEG3* Promotor aufgetragen. Bei beiden Allelen war die ER der *MEG3* IG-DMR signifikant höher als die des *MEG3* Promotors ($p < 0.001$, MWU). Da von dem Nabelschnurblut kein Material mehr vorhanden war, konnten leider keine Expressionsuntersuchungen durchgeführt werden um die Methylierungseffekte regulatorisch zu validieren.

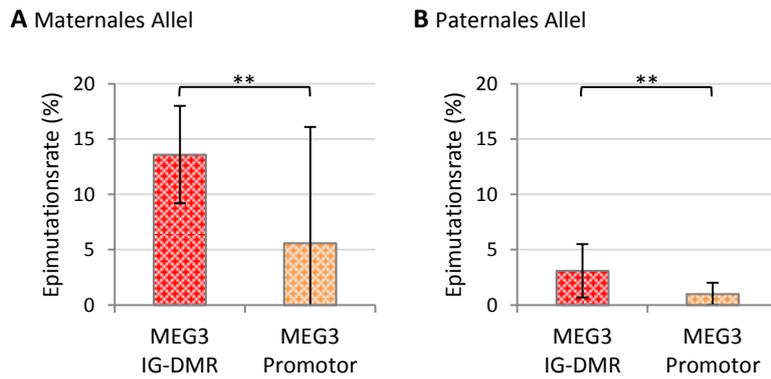


Abbildung 44: Illumina MiSeq ERs für *MEG3* IG-DMR und *MEG3* Promotor

A: maternales Allel, B: paternales Allel. Analysiertes Gewebe: FCB. Für beide Allele ist die Epimutationsrate für *MEG3* IG-DMR signifikant höher als die Epimutationsrate für *MEG3* Promotor. Das Signifikanzniveau entsprach * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.2.3 GDM/Kontrollen Gruppenvergleich

Alle erhobenen NGS DBS-Daten wurden einem Gruppenvergleich zwischen GDM Proben und Kontrollen unterzogen. Die Methylierungsmittelwerte, unterschieden in die Roche GS Junior und die Illumina MiSeq Kohorten, sind in Tabelle 45 und Abbildung 45 aufgeführt. Mit Ausnahme der GDM Subgruppe für *MEST* (48,9 %) lag die Methylierung für alle Subgruppen über den hypothetischen 50 % (sogar bis über 70 % für die *MEG3* Promotor Kontrollen) und zeigte damit eine milde bis moderate Hypermethylierung. Die Gruppendifferenzen betragen für die GS Junior Daten -0,5 % für *MEG3* IG-DMR und -8,5 % für *MEST*, wobei beide Male die GDM Gruppe niedriger methyliert war als die Kontroll-Gruppe. Obgleich die Differenz für *MEST* mit -8,5 % relativ groß war, wurde aufgrund einer zu niedrigen Probenzahl keine statistische Signifikanz erreicht, lediglich eine Tendenz mit $p = 0,089$ (t-Test). Für die Illumina MiSeq Vergleiche lagen die Gruppenunterschiede bei -9 % für den *MEG3* Promotor ($p = 0,011$) und bei jeweils -4 % für *MEST* ($p = 0,035$) und *PEG3* ($p = 0,037$). Die Differenzen waren für die drei Gene statistisch signifikant und wurden mit dem t-Test für normalverteilte Proben getestet. Für *MEG3* IG-DMR wurde kein Gruppenunterschied festgestellt. Innerhalb einer umfassenden Pyrosequenzierungsstudie (an derselben Probensammlung) wurde bereits ein GDM/Kontrollen Gruppenunterschied in einer vergleichbaren Größenordnung festgestellt. Die Methylierungsdifferenz betrug -3,8 % zwischen I-GDM Proben ($n = 83$) und Kontrollen ($n = 57$) und -4,6 % zwischen D-GDM ($n = 80$) und Kontrollen ($n = 57$) [195]. Dieser

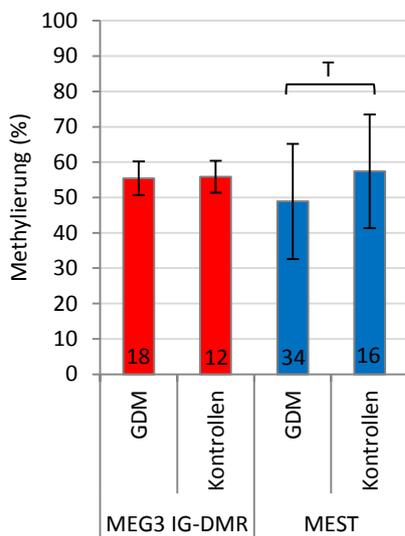
Effekt konnte nun auch auf NGS-Level an einer niedrigeren Probenzahl mit unabhängigen Sequenzierungsmethoden bestätigt werden.

Tabelle 45: Methylierung im GDM/Kontrollen Vergleich

Roche GS Junior			Methylierung (%)				
Gen	Gewebe	Gruppe	n	Min	Max	Mittelwert	SD
MEG3 IG-DMR	FCB	GDM	18	44,4	65,2	55,4	4,8
		Kontrollen	12	49,5	63,8	55,9	4,5
MEST	FCB	GDM	34	17,0	74,0	48,9	16,3
		Kontrollen	16	13,5	73,6	57,4	16,1
Illumina MiSeq							
MEG3 IG-DMR	FCB	GDM	37	46,5	64,3	52,0	3,9
		Kontrollen	8	39,8	57,8	52,0	5,8
MEG3 Promotor	FCB	GDM	25	47,5	75,0	62,6	7,7
		Kontrollen	6	65,2	76,4	71,6	4,9
MEST	FCB	GDM	42	35,5	66,0	51,7	6,7
		Kontrollen	16	48,8	64,7	55,7	5,1
PEG3	FCB	GDM	14	54,2	68,4	61,0	3,9
		Kontrollen	7	58,7	68,5	65,0	3,5

FCB: fetal cord blood; GDM: gestational diabetes mellitus; SD: standard deviation; Min: Minimum; Max: Maximum.

A Roche GS Junior



B Illumina MiSeq

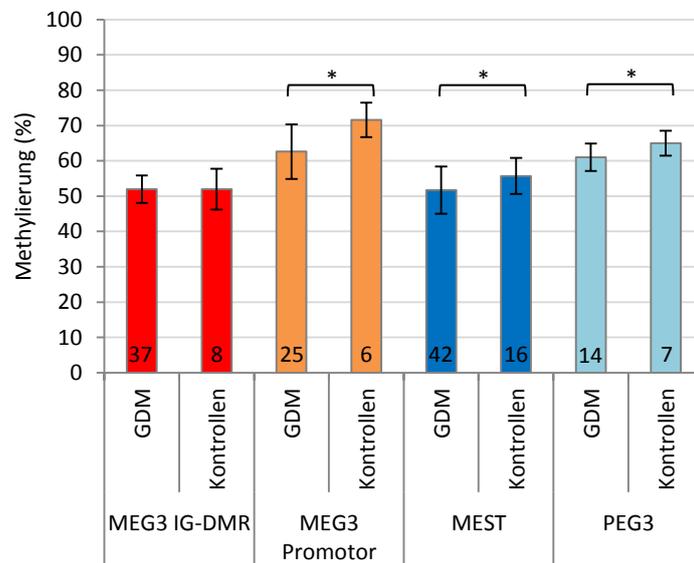


Abbildung 45: Methylierung im GDM/Kontrollen Vergleich

Analysiertes Gewebe: fetal cord blood (FCB). Die Daten sind als Mittelwerte ± SD dargestellt. Das Signifikanzniveau entsprach *p<0,05; **p<0,01. T: Tendenz.

A Roche GS Junior: Es wurden keine signifikanten Gruppenunterschiede festgestellt. Für MEST konnte mit p = 0,089 (t-Test) eine Tendenz festgestellt werden.

B Illumina MiSeq: Für *MEG3* Promotor, *MEST* und *PEG3* wurden signifikante Gruppenunterschiede festgestellt, wobei die GDM Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen in allen drei Genen hypomethyliert war ($p = 0,011$; $p = 0,035$; $p = 0,037$; t-Test).

Tabelle 46 und Tabelle 47 geben die Methylierung bzw. die Epimutationsraten der beiden parental Allele an. Die bereits beschriebene Hypermethylierung des nicht geprägten Allels wurde erneut festgestellt, allerdings zeigte sie keine Assoziation zu Gestationsdiabetes. Alle anderen für die Probenkohorte verfügbaren Parameter (vergleiche dazu Tabelle 2) wurden ebenfalls getestet, korrelierten jedoch nicht mit dem HNA-Effekt. Im GDM/Kontrollen Vergleich wurden keine signifikanten Gruppenunterschiede für die Epimutationsraten festgestellt. Die Methylierung betreffend zeigte sich lediglich eine signifikante Differenz innerhalb der paternalen *MEG3* Promotor DMR ($p = 0,036$, Welch; Illumina MiSeq Abbildung 46 A1) und eine Tendenz innerhalb der maternalen *MEG3* IG-DMR ($p=0,068$, Welch; Roche GS Junior Abbildung 46 B2). Alle anderen Vergleiche waren auch für die Methylierung nicht signifikant. Eine detaillierte Unterscheidung zwischen I-GDM und D-GDM Proben wurde ebenfalls durchgeführt, wies jedoch keine signifikanten Differenzen auf. Einzige Ausnahme war die Durchschnittsmethylierung über beide Allele hinweg für die mit $p = 0,045$ (Kruskal-Wallis, Illumina MiSeq Daten) eine schwach signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen I-GDM, D-GDM und Kontrollen festgestellt wurde.

Tabelle 46: Methylierung der elterlichen Allele im GDM/Kontrollen Vergleich

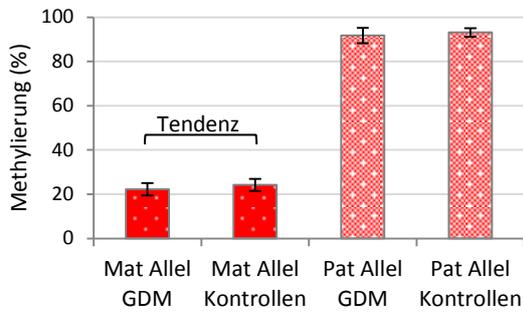
Roche GS Junior			Methylierung maternales Allel (%)					Methylierung paternales Allel (%)			
Gen	Gewebe	Gruppe	n	Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD
<i>MEG3</i> IG-DMR	FCB	GDM	18	16,9	26,6	22,2	2,8	86,7	98,0	91,7	3,5
		Kontrollen	12	20,7	29,6	24,2	2,8	89,9	95,9	93,1	1,9
<i>MEST</i>	FCB	GDM	34	81,5	98,7	93,1	4,6	6,3	44,5	19,8	10,3
		Kontrollen	16	84,4	97,8	93,8	4,7	5,4	58,5	25,7	15,8
Illumina MiSeq											
<i>MEG3</i> IG-DMR	FCB	GDM	37	16,9	26,0	21,1	2,7	87,9	98,1	95,3	2,3
		Kontrollen	8	13,4	28,2	21,4	4,7	94,9	97,4	96,4	0,8
<i>MEG3</i> Promotor	FCB	GDM	25	1,9	54,8	9,1	12	91,8	97,2	94,6	1,5
		Kontrollen	6	4,8	20,7	8,4	6,1	94,8	96,7	95,6	0,7
<i>MEST</i>	FCB	GDM	42	82,1	98,6	95,3	3,5	5,6	42,0	22,5	8,7
		Kontrollen	16	93,1	98,9	96,7	1,5	7,7	42,1	22,0	11,5
<i>PEG3</i>	FCB	GDM	14	92,2	98,0	95,4	1,7	2,7	19,4	6,6	5,1

Kontrollen	7	91,4	98,1	96,0	2,2	2,5	14,4	5,6	4,0
------------	---	------	------	------	-----	-----	------	-----	-----

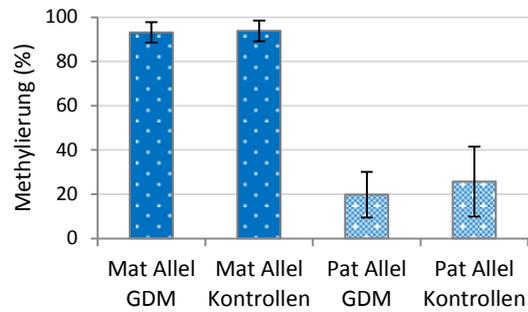
FCB: fetal cord blood; GDM: gestational diabetes mellitus; SD: standard deviation; Min: Minimum; Max: Maximum.

Roche GS Junior

A1 *MEG3* IG-DMR FCB

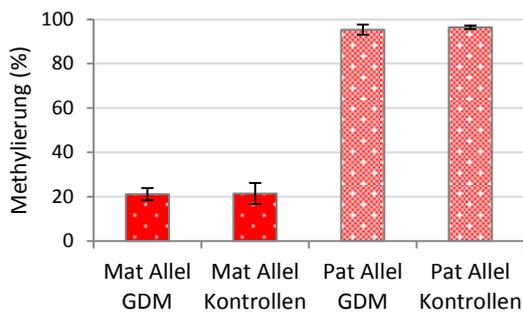


A2 *MEST* FCB

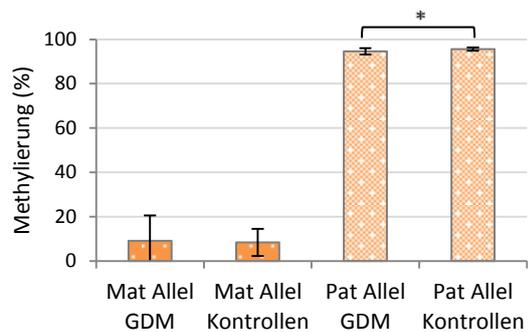


Illumina Miseq

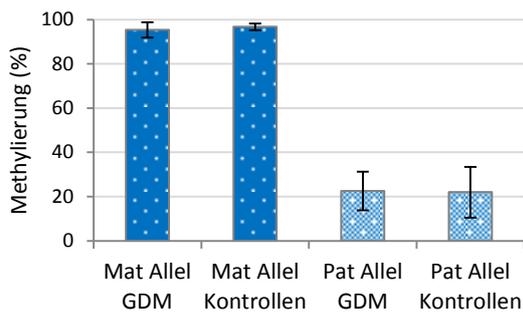
B1 *MEG3* IG-DMR FCB



B2 *MEG3* Promotor FCB



B3 *MEST* FCB



B4 *PEG3* FCB

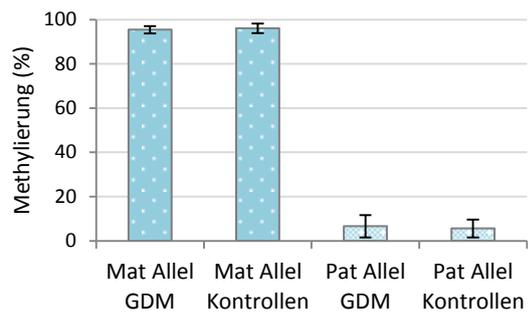


Abbildung 46: Methylierung der elterlichen Allele im GDM/Kontrollen Vergleich

A: Roche GS Junior; B: Illumina MiSeq. Analysiertes Gewebe: fetal cord blood (FCB). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt. Das Signifikanzniveau entspricht * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

A Roche GS Junior: Es gab keine signifikanten Gruppenunterschiede, aber eine Tendenz im maternalen Allel von *MEG3* IG-DMR mit $p = 0,068$ (Welch).

B Illumina MiSeq: Das paternale Allel des *MEG3* Promotors zeigte einen signifikanten Gruppenunterschied mit $p = 0,036$ (Welch).

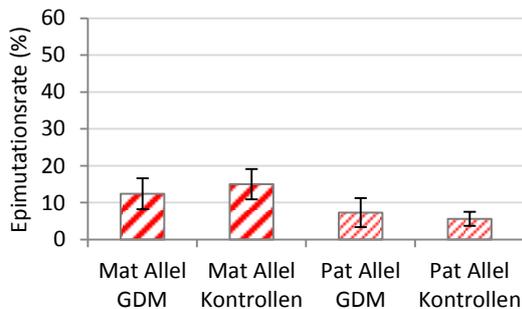
Tabelle 47: Epimutationsraten im GDM/Kontrollen Vergleich

Roche GS Junior			Epimutationsrate maternales Allel (%)				Epimutationsrate maternales Allel (%)				
Gen	Gewebe	Gruppe	n	Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD
<i>MEG3</i> IG-DMR	FCB	GDM	18	4,6	20,5	12,4	4,2	1,1	12,8	7,3	3,9
		Kontrollen	12	9,2	22,1	15,0	4,1	2,4	8,7	5,6	1,9
<i>MEST</i>	FCB	GDM	34	0,0	15,4	3,8	4,2	2,1	44,9	15,8	11,7
		Kontrollen	16	0,2	12,9	3,7	4,8	2,4	61,5	24,1	17,8
Illumina MiSeq											
<i>MEG3</i> IG-DMR	FCB	GDM	37	7,6	25,9	13,6	3,8	0,9	11,3	3,4	2,5
		Kontrollen	8	4,9	24,5	13,3	6,7	1,2	2,7	1,9	0,6
<i>MEG3</i> Promotor	FCB	GDM	25	0,3	54,5	6,0	12	0,1	3,9	1,1	1,0
		Kontrollen	6	2,1	4,9	3,8	1,1	0,3	1,0	0,6	0,3
<i>MEST</i>	FCB	GDM	42	0,2	13,6	2,0	3,3	1,0	41,8	18,8	9,9
		Kontrollen	16	0,3	4,6	1,2	1,5	0,7	41,7	18,4	13,5
<i>PEG3</i>	FCB	GDM	14	0,2	5,4	1,5	1,4	0,3	17,3	3,9	5,5
		Kontrollen	7	0,3	6,2	1,3	2,1	0,5	12,8	2,6	4,5

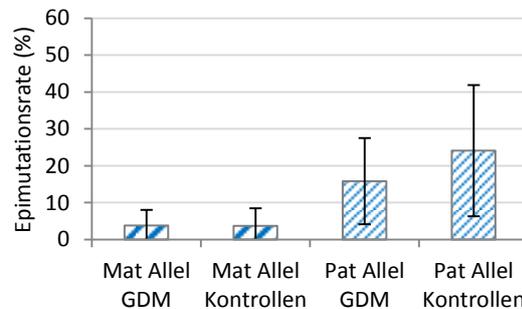
FCB: fetal cord blood; GDM: gestational diabetes mellitus; SD: standard deviation; Min: Minimum; Max: Maximum.

Roche GS Junior

A1 *MEG3* IG-DMR FCB

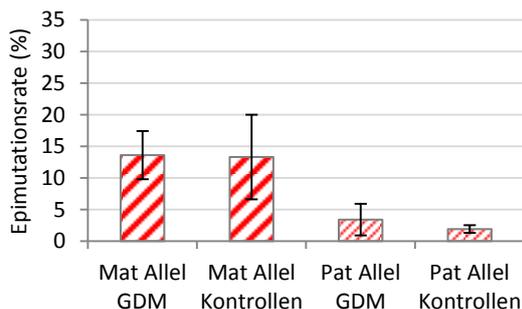


A2 *MEST* FCB

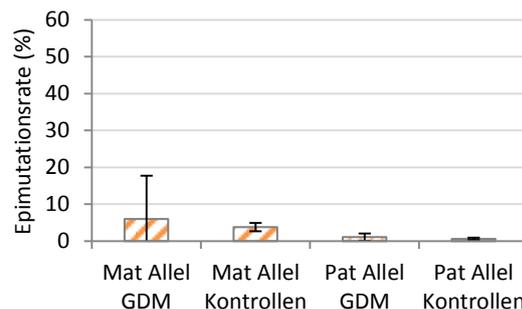


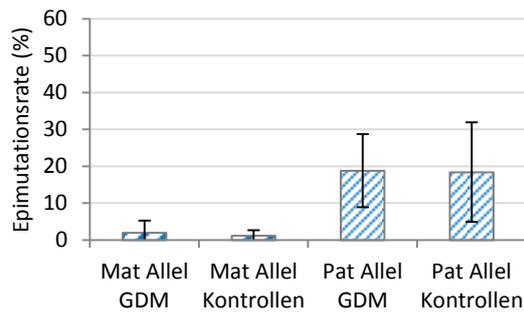
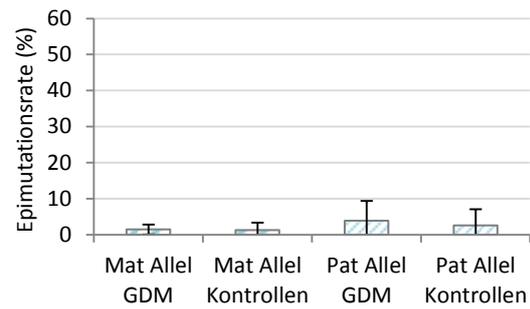
Illumina MiSeq

B1 *MEG3* IG-DMR FCB



B2 *MEG3* Promotor FCB



B3 *MEST* FCB**B4** *PEG3* FCB**Abbildung 47: Epimutationsrate der elterlichen Allele im GDM/Kontrollen Vergleich**

A: Roche GS Junior; B: Illumina MiSeq. Analysiertes Gewebe: fetal cord blood (FCB). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt. Es konnten keine signifikanten Gruppenunterschiede festgestellt werden. Das Signifikanzniveau entsprach $*p < 0,05$; $**p < 0,01$. Es wurden keine signifikanten Gruppenunterschiede festgestellt.

Unmethyliertes Allel: *MEG3* IG-DMR maternales Allel, *MEG3* Promotor maternales Allel, *MEST*: paternales Allel, *PEG3* paternales Allel

Methyliertes Allel: *MEG3* IG-DMR paternales Allel, *MEG3* Promotor paternales Allel, *MEST*: maternales Allel, *PEG3* maternales Allel

4 Diskussion

4.1 Genomweite GDM-Studie zur Findung von Kandidaten-Genen

4.1.1 *Ad infinitum* Kreislauf ungünstiger GDM-Auswirkungen auf die nächste Generation

Die Verbreitung von mütterlichem Adipositas nimmt seit Jahrzehnten global zu und ist nicht nur auf Industrieländer beschränkt, sondern auch in Entwicklungs- und Schwellenländern ansteigend [187, 249, 250]. Die Gründe für die starke Zunahme sind multifaktoriell und reichen über körperliche Inaktivität verbunden mit übermäßiger Kalorieneinnahme bis hin zu genetischer Prädisposition [178, 185, 249, 251]. Während der Schwangerschaft ist Fettleibigkeit der stärkste Risikofaktor für die Entwicklung eines Gestationsdiabetes [182]. Es sind einige Studien bekannt, die zeigen, dass GDM vielfältige negative intrauterine Auswirkungen hat. Zum Beispiel ein erhöhtes Präeklampsie-Risiko, Harnwegs- und Nierenbeckenentzündungen, Plazentastörungen aber auch peripartale Schwangerschaftskomplikationen und Geburtsverletzungen, bedingt durch Makrosomie und einem erhöhten Geburtsgewicht der Kinder (LGA) [249, 252]. Mütterliche Faktoren wie gewichtsinduzierter Bluthochdruck oder eine sehr starke Gewichtszunahme während der Schwangerschaft können sich ebenfalls nachteilig auf den Geburtsprozess auswirken. Durch den GDM entsteht in der Mutter ein relativer Insulinmangel, da die Bauchspeicheldrüse nicht in der Lage ist, den durch die Schwangerschaft induzierten erhöhten Insulinbedarf zu decken und es kommt zu einer Überzuckerung (Hyperglykämie) [253]. Gelangt folglich auch zu viel Glukose in den kindlichen Kreislauf, regt das eine übermäßige Produktion von Insulin (Hyperinsulinismus) und eine starke Gewichtszunahme des ungeborenen Kindes an, teilweise verbunden mit einer die Lunge und Leber betreffenden Reifeverzögerung. Insulin fungiert als Wachstumsfaktor für Muskulatur und Fettgewebe [183, 254]. Proportional zum Geburtsgewicht steigt auch der Anteil an Kaiserschnitten an. Zahlreiche Studien belegen langfristige negative Auswirkungen pränataler intrauteriner GDM-Exposition für die Kinder, die sich bis ins Erwachsenenalter oder lebenslang manifestieren. Zu diesen gehören Beta-Zellhypertrophie, ein erhöhtes Risiko für Adipositas, Typ 2 Diabetes und Herz-Kreislauf-Erkrankungen, metabolische Erkrankungen bis hin zu neuropsychiatrischer Morbidität (im Speziellen Autismus-Spektrum-Störungen (ASD)) [183, 187-190, 192, 255-258]. Daraus ergibt sich ein *ad infinitum* Kreislauf ungünstiger Schwangerschafts-Einflüsse und Konsequenzen: Babys aus GDM-Schwangerschaften haben selbst ein erhöhtes Risiko für metabolische

Krankheiten und laufen Gefahr, dieses (z.B. als GDM-Mütter) wiederum an die nächste Generation weiterzugeben [193].

4.1.2 GDM-induzierte DNA-Methylierungsveränderungen

In Maus-Studien konnte gezeigt werden, dass der GDM-Effekt über Veränderungen in Spermien-Methylierungsmustern von GDM-Nachkommen transgenerational weitervererbt wird [259-261]. Die Mechanismen, die der fetalen Programmierung zugrunde liegen, sind immernoch weitgehend unverstanden, epigenetische Regulation scheint dabei jedoch eine essentielle Rolle zu spielen [170, 181, 260, 262, 263]. GDM-assoziierte Veränderungen betreffen zumeist die DNA-Methylierungsmuster der Nachkommen und wurden von einer steigenden Anzahl an Studien in leicht zugänglichen postnatalen Geweben wie Plazenta oder Nabelschnurblut untersucht [195, 259, 263-271]. Über die Plazenta wird der Nahrungs- und Gastransfer von der Mutter zum Kind bewerkstelligt und der Abtransport der Abfallprodukte aus dem kindlichen Stoffwechsel gewährleistet, daher ist die Plazenta vermutlich besonders von GDM-Effekten betroffen. Generell wird GDM mit einer globalen Hypermethylierung der Plazenta assoziiert [264]. Methylierungsveränderungen von Adiponectin [266], sowie einigen Glucose-Transportern (GLUTs) [268] und einer verminderten Leptin-Expression [265] sind in der Plazenta und teilweise in FCB ebenfalls bekannt. Da das Epigenom verschiedener Gewebe und Organe sehr unterschiedlich sein kann, wäre es besonders für epigenetische Studien wünschenswert, verschiedene fetale Gewebe untersuchen und miteinander vergleichen zu können. Aufgrund ethischer und legaler Einschränkungen ist der Zugang zu anderen Geweben als Nabelschnurblut oder Plazenta für Forschungszwecke allerdings sehr schwierig bis unmöglich. Folglich war es in dieser Studie nur möglich FCB von Neugeborenen zu untersuchen, aber kein Gehirngewebe, Fettgewebe oder Langerhans-Inseln, die wahrscheinlich eher zu den Zielgeweben der Pathogenese von Gestationsdiabetes gehören als Blut. Humanes Gewebe ist generell für viele Fragestellungen deutlich schwerer zugänglich, als das von Tiermodellen und unterliegt daher auch größeren externen Einflüssen. Bei der Suche nach Markern und der Konstruktion von Risiko-Prädiktoren muss für epigenetische Untersuchungen daher sehr häufig ein Kompromiss zwischen der funktionellen Relevanz des untersuchten Gewebes und der Verfügbarkeit desselben, gemacht werden. Oft ist die Entnahme des optimalen Zielgewebes beim lebenden

Organismus unmöglich, ohne dessen körperliche Integrität einzuschränken (z.B. Gehirnbiospien).

4.1.3 Bewertung des GDM-Array-Screenings und der Validierung der Kandidaten-Gene

Übereinstimmend mit anderen genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) waren die GDM-assoziierten epigenetischen Veränderungen in unserer Studie zwar weit gestreut (viele Gene waren betroffen), aber auf Einzel-Gen Ebene eher von geringer Effektgröße (die Gruppenunterschiede zeigten sich nur in einer Differenz von wenigen Prozentpunkten). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass der GDM-Effekt insgesamt polygen bedingt wird, wobei jedes Gen einen kleinen Einfluss auf den Phänotypen ausmacht und sich die Effekte verschiedener Gene aufsummieren. Auch innerhalb der gesunden Neugeborenen (Kontrollen) traten Schwankungen der DNA-Methylierung bei der Pyrosequenzierung auf. Die Auswirkungen des GDMs offenbaren sich daher nicht im Individuum selbst, sondern erst in einem Gruppenvergleich mit einer hohen Probenzahl. Die interindividuelle Varianz und die niedrige GDM-Effektgröße in Methylierungsprozentpunkten machen es demnach derzeit leider unmöglich, aus den neuen GDM-Genen diagnostische oder klinische Anwendungen zu generieren. Trotz der vergleichsweise niedrigen Effektgröße konnten zahlreiche neue Loci/Gene identifiziert werden (siehe Tabelle 30), die eine wichtige Rolle für die fetale Programmierung von GDM-Nachkommen spielen und in diesem Kontext intensiver untersucht werden sollten. Je mehr GDM-Gene insgesamt gefunden und aus verschiedenen (GWAS-)Studien zusammengetragen werden, desto plausibler wird es, einen polygenen epigenetischen Risiko-Prädiktor erstellen zu können, der das Ziel hat, negative Auswirkungen intrauteriner Exposition für die Nachkommen vorhersagbar und besser abschätzbar zu machen. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass das epigenetische Profil nicht nur abhängig vom Gewebetyp ist, sondern auch in unterschiedlichen Zelltypen mitunter stark variiert. Um sicherzugehen, dass es zu keiner Ergebnisverfälschung aufgrund unterschiedlicher Zellkompositionen des analysierten FCBs zwischen den Untersuchungsgruppen kam, wurde die Zellzusammensetzung bioinformatisch (basierend auf den Array-Daten) berechnet. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den GDM-Proben und den Kontrollen detektiert.

4.1.4 Matching und Störfaktoren-Korrektur

Trotz des Versuchs die Proben für die Experimente (Array-Versuche und Pyrosequenzierungsvalidierung) anhand der verfügbaren klinischen Parameter optimal zu matchen, konnten einige Störfaktoren (darunter sowohl mütterliche als auch kindliche Parameter) nicht ausgeschlossen werden. Über eine statistische Korrektur der größten Confounder (kindliches Gestationsalter bei der Geburt, Geschlecht und mütterlicher BMI) wurde der Einfluss bestmöglich herausgerechnet. Innerhalb der I-GDM-Mütter war der durchschnittliche BMI höher als in den D-GDM- bzw. den Kontroll-Müttern, das Gestationsalter bei Geburt in den I-GDM-Kindern dafür aber niedriger als bei den D-GDM-Kindern bzw. Kontrollen. GDM-bedingte Makrosomien sowie ein gesteigertes Größenwachstum und eine erhöhte Gewichtszunahme erklären ein erhöhtes Geburtsgewicht der GDM-Babys. Weil der Platz im Uterus dadurch früher zur Neige geht, werden diese Kinder auch früher geboren als Non-GDM-Kinder, resultierend in einem niedrigeren durchschnittlichen Gestationsalter. Darüber hinaus scheint auch das kindliche Geschlecht (Y/X Gen-Dosis) in Wechselwirkung mit einem mütterlichen angiotensin converting enzyme (ACE) I/D Polymorphismus einen Einfluss auf den Blutzucker und damit auf GDM zu haben [272]. Für die Pyrosequenzierungsergebnisse wurde deshalb ein multivariates Regressionsmodell erstellt, in dem die drei Confounder berücksichtigt wurden. Für die fünf analysierten Gene (*ATP5A1*, *PRKCH*, *SLC17A4*, *MFAP4* und *HIF3A*) blieben die signifikanten GDM-Effekte auch nach der Korrektur weiter signifikant, was die Qualität der Untersuchungsmethoden (Microarray und Pyrosequenzierung) sowie die Glaubhaftigkeit des Fundes unterstreicht. Die untersuchte Probenanzahl von insgesamt 132 Array-Proben und 185 Pyrosequenzierungs-Proben entspricht in der Größenordnung der aktuellen Norm vergleichbarer Studien. Dennoch wären für komplexe Krankheiten wie GDM umfangreichere, Länder- und Kohorten-übergreifende genomweite Assoziationsstudien mit größeren Probenzahlen wünschenswert. Es ist anzunehmen, dass andere, konzeptionell sehr ähnliche Microarray-Studien [259, 270, 273] ebenfalls mit Confounders unterwandert sind, die mutmaßlich zu falsch-positiven bzw. falsch-negativen Ergebnissen führen. Das würde in der Summe wiederum erklären, warum die Überlappung genomweiter signifikanter Hits zwischen solchen Studien im Allgemeinen sehr gering ist. Unterschiede in mütterlichen und kindlichen Komorbiditäten, aber auch in den Ethnien der untersuchten Familien, können einen großen Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben. Dasselbe gilt für Diskrepanzen bei

den GDM Diagnose-Kriterien oder der Behandlung während der Schwangerschaft [178, 249, 250, 252]. Sowohl national als auch international sind derzeit unterschiedliche Grenzwerte in Gebrauch, weshalb sich die Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) wie auch die Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) um einheitliche GDM-Diagnosekriterien bemühen. Die in dieser Studie verwendeten Proben wurden alle in einer einzigen Geburtsklinik (Gynäkologie der Städtischen Kliniken Mönchengladbach) gesammelt und die teilnehmenden Probanden hatten zu über 90% einen mitteleuropäischen (kaukasischen) familiären Hintergrund. Für die Mehrheit der Mütter waren keine Vorerkrankungen bekannt, Einzelne litten unter Bluthochdruck, Schilddrüsenfehlfunktionen oder Typ 1 oder Typ 2 Diabetes mellitus (TDM1 bzw. TDM2) vor der Schwangerschaft. Schwangerschaften, in denen Präeklampsien oder Frühgeburten (< 37. SSW) auftraten, wurden ebenso vermerkt wie SGA (< 10% Perzentile), AGA (10% - 90% Perzentile) und LGA (> 90% Perzentile) Babys.

4.1.5 I-GDM- versus D-GDM-Gruppenvergleich

In Deutschland wird Gestationsdiabetes, sobald er zwischen der 24. und 27. SSW über einen oralen Glukosetoleranztest als solcher erkannt wurde, unverzüglich behandelt. Besteht anamnetisch ein erhöhtes Risiko (z.B. Übergewicht oder Diabetes in der Verwandtschaft), wird auch schon früher, im ersten Schwangerschaftsdrittel, ein gezielter Suchtest durchgeführt. Die Behandlung erfolgt über eine strenge Stoffwechseleinstellung. Dies erfolgt zuerst indem eine fettarme, kohlenhydrat- und balaststoffreiche Diät auferlegt wird (D-GDM). Es wird empfohlen, mehrere kleinere Mahlzeiten anstelle von drei großen Mahlzeiten über den Tag verteilt zu sich zu nehmen und es sollte ein Diätberater bzw. ein Diabetologe konsultiert werden. Der Blutzuckerspiegel muss engmaschig gemessen und protokolliert werden. Reicht die diätische Behandlung alleine nicht aus, um die erforderlichen Zielwerte anhaltend zu erreichen, wird auf eine Insulintherapie umgestellt (I-GDM). Demnach ist davon auszugehen, dass D-GDM Patientinnen eine mildere Ausprägung des Schwangerschaftsdiabetes aufweisen als I-GDM Patientinnen. Im I-GDM/Kontrollen-Vergleich konnten deutlich mehr signifikante Effekte festgestellt werden als im D-GDM/Kontrollen-Vergleich. Wir können nicht mit Sicherheit sagen, ob sich die Insulin-Behandlung selbst auch auf das Epigenom auswirkt oder nicht, es ist aber wahrscheinlich, dass die Effekte auf den schwerwiegenderen GDM-Phänotypen der Mütter

zurückzuführen sind, der die Insulin-Therapie unabdingbar machte. Im Gegensatz zu den D-GDM-Subgruppen, wurde in 10% - 16% der I-GDM-Mütter schon vor der Schwangerschaft Typ 1 oder Typ 2 Diabetes mellitus (TDM1/TDM2) diagnostiziert. Die betroffenen Embryonen waren folglich schon während der frühen Entwicklung, ab Beginn der Schwangerschaft, widrigen Umgebungsbedingungen ausgesetzt.

4.1.6 Allgemeine GDM-Einstellung und HbA1C

Beim Verdacht auf Gestationsdiabetes ist die Bestimmung des HbA1c-Wertes ein wichtiger Schritt. Er wird auch Langzeitblutzuckerwert genannt, weil er herangezogen werden kann, um Rückschlüsse auf die Einstellung des Blutzuckerwertes der letzten acht bis zwölf Wochen zu ziehen. Die Lebensdauer und Erneuerung der roten Blutkörperchen bestimmt dabei den genauen Zeitraum. Bei Gesunden liegt der HbA1C-Wert um 30 mmol/mol (5%), bei nicht eingestellten Diabetes-Patienten deutlich höher. Der HbA1c-Wert ist umso höher, je öfter der Blutzuckerwert erhöht war. In unserer Studienkohorte wurde der HbA1c-Wert nur für die GDM-Mütter, nicht für die Kontrollen erhoben. Die HbA1c-Werte für die I-GDM Mütter waren innerhalb der Array-Kohorte B mit $5,9 \pm 0,6$ und der Pyrosequenzierungskohorte mit $5,8 \pm 0,4$ signifikant höher ($p < 0,001$) als die D-GDM-Werte mit $5,5 \pm 0,4$ und $5,5 \pm 0,3$. Insgesamt waren aber alle Werte im Normalbereich bzw. nur leicht erhöht, was darauf schließen lässt, dass der GDM ausnahmslos in allen Probandinnen erkannt und eingestellt wurde. Unsere Studienbedingungen repräsentieren damit die aktuelle Situation in Industrieländern, mit einem deutlichen Anstieg der GDM-Schwangerschaften in den letzten Jahrzehnten, aber auch einer gewissenhaften Behandlung desselben. Die Auswirkungen auf Kind und Mutter sind zwar gegeben, aber sicherlich deutlich geringer, als in Ländern in denen GDM nicht routinemäßig untersucht wird. Es ist anzunehmen, dass eine frühe Diagnose in Verbindung mit einer optimalen Behandlung die epigenetischen Fehlprogrammierungen in den GDM-Kindern reduziert. Das könnte auch erklären, warum in unserer Studie mit 65 signifikant differenziell methylierten CpGs eine deutlich niedrigere Anzahl an auffälligen CpGs gefunden wurde als in einer ähnlichen Studie mit südasiatischen Probandinnen, in der 1485 signifikante CpGs detektiert wurden und keine HbA1c-Werte angegeben waren [270]. Ein zweiter Grund für die Diskrepanz könnte auch in der Stringenz der Filterkriterien bei der bioinformatischen Auswertung zu finden sein.

4.1.7 Kandidaten-Gene

In dieser Studie wurden 65 neue GDM-assoziierte CpGs gefunden, von denen 52 in Genen lokalisiert waren und drei mittels Pyrosequenzierung validiert werden konnten. *HIF3A*, ein weiteres, durch Literaturrecherche aufgefallenes Adipositas-Gen [240, 254, 274-280], konnte erstmals ebenfalls mit GDM assoziiert werden. Hypoxia inducible factor 3 alpha subunit (*HIF3A*) ist auf Chromosom 19q13 lokalisiert und kodiert ein Protein, das als Alpha-3-Untereinheit Teil einer alpha/beta-Heterodimer-Familie für Transkriptionsfaktoren ist (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/64344>). Die Alpha-3-Untereinheit ist eine von drei Isoformen, die mit der Beta-Untereinheit (kodiert durch das *ARNT*-Gen) ein Dimer bildet. Durch alternatives Spleißen existieren mindestens sechs oder sieben Varianten der Alpha-3-Untereinheit [281-283]. HIFs regulieren in verschiedenen Geweben die Aktivität und Expression zahlreicher Gene, deren Produkte involviert sind in physiologische und zelluläre Reaktionen auf Hypoxie (verminderte bis unzureichende Sauerstoffversorgung) [238]. Die *HIF3A*-Hypoxie-Regulation ist sowohl während der Entwicklung als auch in pathologischen Situationen von großer Bedeutung [282]. Die Transaktivierungsdomäne der Alpha-1- und der Alpha-2-Untereinheit fehlt in der Alpha-3-Untereinheit. Man vermutet, dass die Alpha-3-Untereinheit in Faktoren vorkommt, die die Hypoxie-induzierte Gen-Expression negativ regulieren [284]. *HIF3A* ist jedoch nicht nur in die Hypoxie-Reaktion involviert, sondern ebenfalls an vielfältigen anderen Prozessen beteiligt, die die Ausbildung von Diabetes mellitus und Adipositas mitbeeinflussen, wie dem Glukose- und Aminosäure-Metabolismus oder der Differenzierung von Adipozyten [239, 285]. In einer epigenomweiten Assoziationsstudie (EWAS) wurde Blut von 479 europäisch-kaukasischen Probanden mit Illumina Infinium 450K Methylierungsarrays untersucht und eine positive Assoziation des BMIs mit der Methylierung von drei CpG-Stellen (cg16672562, cg22891070 und cg27146050) im *HIF3A*-Promotor gefunden [240]. Diese Assoziation wurde in Blut-Proben zweier weiterer kaukasischer Replikations-Kohorten (n = 339 und n = 1789) bestätigt, ebenso wie in 635 Fettgewebe-Proben, jedoch nicht in 395 Haut-Proben. Die elf CpGs, die in unserer Studie untersucht wurden, befanden sich in derselben Region wie die drei signifikanten CpG-Stellen der Dick *et al.* [240] Studie, die ebenfalls abgedeckt waren (CpG6, 8 und 11). Agha *et al.* [254] bestätigten in einer zweiten Studie aus demselben Jahr den Fund in 106 Fettgewebe-Proben kaukasischer Herkunft, ebenso wie Rönn *et al.* [276] in 96 kaukasischen Fettgewebe-Proben. Die Assoziation im Blut konnte dabei nicht bestätigt werden. Pan *et al.* [277] fand

2015 eine Korrelation der *HIF3A*-FCB-Methylierung mit dem Geburtsgewicht und der späteren Adipositas-Ausprägung in 991 asiatischen Kindern. Wang *et al.* [279] bestätigte den Adipositas-Effekt zusätzlich im Blut von 212 asiatischen Kindern, von denen 107 stark übergewichtig waren und eine höhere DNA-Methylierung aufwiesen als die normalgewichtigen Kontrollen. Alle diese Studien weisen darauf hin, dass die *HIF3A*-Methylierung der Zielregion eine Rolle in der Entstehung von Diabetes mellitus spielt und besonders in der frühen Entwicklung von Bedeutung ist. Es wurde eine positive Assoziation der Methylierung in verschiedenen Geweben (FCB, adultem Vollblut, Fettgewebe), verschiedenen Altersstufen (Neugeborene, Kinder, Erwachsene) und in verschiedenen Ethnien (europäisch-kaukasisch, asiatisch und afrikanisch-amerikanisch) gefunden. In unserer Studie konnte zum ersten Mal Gestationsdiabetes mit einer erhöhten *HIF3A*-Methylierung in den drei Microarray-CpG-Stellen aus Dick *et al.* [240] (cg16672562 entspricht Pyrosequenzierungs-CpG6, cg22891070 entspricht CpG8 und cg27146050 entspricht CpG11), aber auch in den acht zusätzlichen benachbarten Pyrosequenzierungs-CpGs, assoziiert werden. GDM-Neugeborene zeigten eine höhere FCB-Methylierung als Kontroll-Babys und haben damit wahrscheinlich ein höheres Risiko selbst einmal Adipositas zu entwickeln [240, 274]. Im Gegensatz zu *HIF3A* wurde in allen anderen untersuchten Genen eine Hypomethylierung der GDM-Proben im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt. Mit Ausnahme von *MFAP4* bestätigte das die Array-Ergebnisse sehr gut. Das ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1 (*ATP5A1*)-Gen ist auf Chromosom 18q21.1 lokalisiert und kodiert eine Untereinheit des mitochondrialen ATP-Synthase-Komplexes. Die ATP-Synthase ist ein Schlüsselenzym der mitochondrialen Energie-Bereitstellung und katalysiert mithilfe eines elektrochemischen Protonen-Gradienten über die innere Zellmembran die ATP-Synthese. Sie verhindert dadurch oxidativ bedingte Schäden der Mitochondrien. Das Gen kodiert die alpha-Untereinheit des F1-Komplexes. Insgesamt sind fünf unterschiedliche Untereinheiten bekannt, die aus alternativem Spleißen resultieren. Der F1-Komplex bildet das katalytische Zentrum der ATP-Synthase und bindet an den FO-Komplex, der in die Membran eingebunden ist und einen Protonen-Kanal darstellt. Es sind drei Pseudogene auf den Chromosomen zwei, neun und 16 bekannt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/498>). Genetische Defekte in *ATP5A1* und daraus folgende Störungen der ATP-Synthase Funktion verursachen schwerwiegende neonatale mitochondriale Enzephalopathien [286] und Kardiomyopathien [287]. In einer anderen

Studie konnte gezeigt werden, dass *ATP5A1*-Defekte mit kardiomyopathischen Veränderungen in diabetischen Mäusen assoziiert sind [231]. Das microfibrillar associated protein 4 (*MFAP4*) gehört zu einer Fibrinogen-verwandten Protein-Superfamilie und befindet sich auf Chromosom 17q11.2 innerhalb der Smith-Magenis Syndrom (SMS) Region [288]. Es sind bisher zwei Transkript-Varianten bekannt, die besonders in Blutgefäßen exprimiert werden und vermutlich wichtig für den Aufbau der extrazellulären Matrix sind [236]. Sie sind in Prozesse der interzellulären Interaktion, der Zelladhäsion und der Gewebe-Homöostase involviert (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4239>) [288, 289]. Die *MFAP4*-Werte im Blutserum von Patienten konnten mit verschiedenen kardiovaskulären Zuständen [236] und diabetisch bedingter Neuropathie assoziiert werden [290]. Die Protein Kinase C eta (*PRKCH*) befindet sich auf Chromosom 14q23.1. Protein Kinasen C (PKC) können selbst entweder durch Diacylglycerol oder Kalzium aktiviert werden und phosphorylieren verschiedenste Zielproteine unterschiedlicher Signalkaskaden. Sie dienen Tumor-fördernden Phorbolestern als Rezeptoren und werden von ihnen aktiviert, wodurch Zellwachstum sowie Gen-Expression gesteigert werden [291, 292]. Die spezielle Kinase, für die *PRKCH* kodiert, reguliert die Differenzierung von Keratinozyten, wird hauptsächlich in Epithelzellen exprimiert und ist phospholipid-abhängig und kalzium-unabhängig (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5583>). *PRKCH* ist in die Zellalterung involviert [293] und mit Adipositas assoziiert [232]. *PRKCH*-Polymorphismen treten in Verbindung mit einem erhöhten ischämischen Schlaganfall-Risiko auf [233, 234]. Der solute carrier family 17 member 4 (*SLC17A4*) liegt auf Chromosom 6p22.2 und kodiert einen Natrium/Phosphat-Cotransporter (NPT Homolog) der in der Darmschleimhaut lokalisiert ist und dort die Natrium- und Phosphat-Homöostase reguliert (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10050>) [294, 295]. Die epigenetische Regulation von *SLC17A4* scheint etwas komplizierter zu sein als die der anderen untersuchten Gene. Für das Array-CpG (CpG3 im Pyro-Assay) wurde eine Hypomethylierung der GDM-Proben festgestellt, konkordant mit dem Array-Ergebnis. Die benachbarten beiden CpGs (CpG1 und CpG2) waren dagegen hypermethyliert. Ein solches Muster ist ungewöhnlich, da die Methylierung benachbarter CpGs normalerweise nicht zufällig festgelegt wird, sondern einem gewebe- und fuktionsspezifischen Profil unterliegt [16]. Mithilfe des LASAGNA-Web Tools [296] konnte festgestellt und visualisiert werden, dass das hypomethylierte Array-CpG innerhalb einer p53-Transkriptionsfaktor-Bindestelle liegt. Der Methylierungszustand dieses CpGs könnte Einfluss darauf nehmen, dass p53 an die

Bindestelle binden oder nicht binden kann, was weitere Downstream-Prozesse beeinflussen könnte.

Neben den GDM-assoziierten Genen wurde außerdem ein pH-assoziiertes Gen untersucht. ArfGAP with dual PH domains 1 (*ADAP1*) befindet sich auf Chromosom 7p22.3. Über seine Funktion ist noch nicht viel bekannt, außer dass es ein gehirnspezifisches, GTPase-aktivierendes Protein ist, das auf ADP-Ribosylierungsfaktoren einwirkt und in Neuronen exprimiert wird (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11033>) [297]. Innerhalb der ADAP-Unterfamilie existieren zwei Isoformen, *ADAP1* und *ADAP2* (auch bezeichnet als *CENTA1* und *CENTA2*). *ADAP1* ist sowohl in die Differenzierung als auch die Degenerierung von Neuronen involviert und mit Alzheimer assoziiert [297]. Es wurde untersucht, ob sich das *ADAP1*-Gen mit dem pH-Wert des Nabelschnurblutes korrelieren und darüber mit einem Azidose-Phänotypen assoziieren lässt. Eine Störung des Säure-Basen-Haushaltes, gekennzeichnet durch ein Abfallen des pH-Wertes des arteriellen Blutes, bezeichnet man als Azidose (lat. acidus „sauer“). Es gibt verschiedene Ursachen für eine Azidose. Metabolischen Azidosen sind stoffwechselbedingt, wobei sich zu viele saure Stoffwechselprodukte im Blut ansammeln. Respiratorische Azidosen sind lungenfunktionsbedingt, da CO₂ nicht adäquat abgeatmet werden kann. Auch bei anaerober Glykolyse bedingt durch einen Mangel an Sauerstoff (wie er beim Geburtsvorgang z.B. auftreten kann) kann es zu einer Azidose kommen. Der Normbereich bei gesunden Erwachsenen liegt bei einem pH-Wert Spektrum von 7,35 - 7,45. Unterhalb von 7,35 spricht man von einer Azidose, oberhalb von 7,45 von einer Alkalose. Bei Neugeborenen ist der pH-Wert niedriger, ein bis zwei Stunden nach der Geburt ist auch ein pH-Wert von 7,2-7,3 als normal anzusehen. Der durchschnittliche pH-Wert aller FCB-Untersuchungsgruppen in unserer Studie lag mit $7,263 \pm 0,101$ bis $7,323 \pm 0,050$ somit im erwarteten Normalbereich. Erst bei pH-Werten unter 7,19 spricht man bei Neugeborenen von einer leichten Azidose, unter 7,09 von einer mittleren und unter 7,0 von einer schweren Azidose. Nach dieser Definition litten nur 5,9% der Neugeborenen der Pyrosequenzierungskohorte unter einer Azidose (elf davon unter einer leichten und drei unter einer mittleren Azidose, wobei sowohl GDM-Kinder als auch Kontrollen gleichermaßen betroffen waren). Der Azidose-Phänotyp war mutmaßlich in den Untersuchungskohorten nicht stark genug ausgeprägt oder die Assoziation des *ADAP1*-Gens mit Azidose war ein Artefakt, da die Array-Ergebnisse nicht mit Pyrosequenzierung bestätigt werden konnten. Im

Array-Datensatz B, der zeitlich nach den Validierungsexperimenten durchgeführt wurde, wurde deshalb auf eine vergleichbare Analyse verzichtet.

4.2 DBS-Studie zur Hypermethylierung des nicht-geprägten Allels (HNA)

4.2.1 DBS zur Analyse geprägter Gene

Das weltweite Interesse an epigenetischen Aspekten verbreiteter Volkskrankheiten steigt stetig. Deshalb wurden in den letzten Jahren verschiedene genomweite NGS Methoden für die Analyse von DNA-Methylierungsmustern entwickelt. Methylomweite NGS-Ansätze sind aber immer noch anspruchsvoll in der Auswertung (z.B. Microarrays), kosten- und ressourcenintensiv, sowie häufig technisch kompliziert verbunden mit Antikörper- oder Oligonukleotid-basierten Anreicherungsstrategien z.B. bei dem methylated DNA immunoprecipitation sequencing (MeDIP-seq) und dem methylated DNA capture by affinity purification sequencing (MethylCap-seq) oder einer Verdauung der DNA mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen wie bei dem reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) [298]. Für gerichtete Untersuchungen von Zielregionen (z.B. Promotorregionen, geprägte DMRs oder Gen-Validierungsexperimente) werden immer noch vorherrschend Pyrosequenzierungen durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.6.2). Zweifelsohne eine sinnvolle, schnelle und verlässliche Methodik, jedoch limitiert durch Sequenzierungslänge (bis zu max. 25 bp) und Sequenzierungstiefe (es können nur Durchschnittswerte gemessen werden). Viele Projekte benötigen daher zielgerichtete, Hypothesen-getriebene, high-throughput DNA-Methylierungs-Untersuchungen auf Einzelmolekülebene [206]. Hochauflösende Amplikon-Sequenzierungen von bisulfitkonvertierter Template-DNA wurde als Deep Bisulfite Sequencing (DBS) erstmals auf dem Roche GS Junior etabliert [299-301]. Der darauf abgestimmte „Amplifyzer“ ermöglichte als benutzerfreundliche Analyse-Software auch Nicht-Bioinformatikern Auswertungsmöglichkeiten [219]. Das DBS wurde seither immer weiter modifiziert und abgewandelt z.B. als Bisulfite Amplicon Sequencing (BSAS) [302, 303]. In dieser Studie wurden insgesamt vier iDMRs mit zwei verschiedenen NGS Sequenzierplattformen (Roche GS Junior und Illumina MiSeq) und unterschiedlichen Protokollen zur Library-Vorbereitung untersucht. Für den Roche GS Junior wurde der Amplifyzer und das publizierte DBS-Protokoll der Essener

Humangenetik-Gruppe (Leiter Prof. Horsthemke) verwendet [219, 299]. Für den Illumina MiSeq wurde in dieser Doktorarbeit ein eigenständiges RRBS-inspiriertes Protokoll entwickelt. Für die beiden techniküberlappenden Loci (*MEG3* IG-DMR und *MEST*) wurden mit beiden Herangehensweisen übereinstimmende allelspezifische Effekte auf Methylierungs- und Epimutationsniveau entdeckt. Bisulfit Amplikonsequenzierung geprägter Gene ist technisch anspruchsvoll, da die Konvertierungsbehandlung zu Sequenzdivergenzen zwischen methylierten und unmethylierten Allelen führt. Da sich TG-reiche Produkte besser amplifizieren lassen als GC-reiche Produkte kann es daher zu einem Amplifikationsbias zugunsten des unmethylierten Allels kommen [244]. Auch das Sequenz-Alignment kann durch eine reduzierte Sequenzkomplexität (3 Basen Code) und asymmetrisches C zu T Alignment zu falsch positiven Treffern führen [304]. Um diese Herausforderungen zu meistern wurden die Kriterien für das Herausfiltern der Reads mit ungenügender Sequenzierungsqualität oder Sequenzierungsfehlern sehr streng gesetzt. Außerdem wurden für die beiden DBS-Techniken verschiedene Primerpaare designt, die leicht versetzte Ziel-Regionen amplifizierten. Technische Artefakte können somit hinreichend ausgeschlossen werden, die Ergebnisse beschreiben valide biologische Effekte. Durch eine vorangestellte SNP Genotypisierung wurden heterozygote Proben selektiert, was eine Unterscheidung der parental Allel-Herkunft möglich machte. Für jede Probe konnten mehrere hundert bis mehrere tausend Reads generiert werden, die die individuellen Methylierungsmuster der Ursprungsmoleküle/Allele repräsentierten. Bei einem Sequenzierlauf mit dem Roche GS Junior wurden zwei Gene zu je 29 Proben gepoolt. Für die *MEG3* IG-DMR wurden pro Probe durchschnittlich 796 ± 261 Reads ausgewertet, für *MEST* mit 1.036 ± 355 Reads noch etwas mehr. Die Überführung des DBS auf den Illumina MiSeq erhöhte die Sequenziertiefe allerdings um ein Vielfaches (12 bis 59 Mal). Die Readcoverage für die vier analysierten Loci betrug 46.836 ± 28.743 für die *MEG3* IG-DMR, 13.116 ± 6.593 für die *MEG3* Promotor DMR, 19.928 ± 19.771 für *MEST* und 42.429 ± 17.053 für *PEG3*. Mit dem Illumina MiSeq können bis zu 600 bp lange Amplikons sequenziert und damit pro Assay mehr CpGs abgedeckt werden als mit dem Roche GS Junior, der nur 300 bp erlaubte. In einem Lauf konnten parallel zudem deutlich mehr Gene (bis zu 12 Gene à 24 Proben) sequenziert werden. Die für die Sequenzierung und Library-Vorbereitung notwendige Zeit (nach den amplikonspezifischen PCRs) war für beide Techniken vergleichbar. Damit ist der Illumina MiSeq die deutlich wirtschaftlichere und zeitsparendere Variante, da sowohl mehr Gene als

auch mehr Proben (auf bis auf 96 Proben pro Run erweiterbar) zeitgleich analysiert werden können und die Readcoverage und Amplikonlänge ebenfalls erhöht sind im Vergleich zu dem Roche GS Junior. Das hier selbst entwickelte Protokoll zur Proben-Präparation kann mit vergleichsweise geringem Aufwand modifiziert und auf noch leistungsstärkere Hochdurchsatzsequenzierer wie beispielsweise den Illumina NextSeq oder HiSeq überführt werden. Sowohl die Sequenziertiefe als auch die Sequenzierpower würde dadurch nochmals erheblich gesteigert.

4.2.2 Die Hypermethylierung des nicht-geprägten Allels (HNA)

Ziel dieser Arbeit war jedoch nicht nur die Entwicklung einer neuen unabhängigen DBS-Technik, sondern primär die Gewinnung neuer Einblicke in allgemeine Imprinting Mechanismen sowie die fetale Programmierung über DBS-basierte Einzel-Molekül Methylierungs-Untersuchungen geprägter Gene. Für geprägte Gene erwartet man in der Theorie ein vollständig methyliertes (geprägtes) und ein vollständig unmethyliertes (nicht geprägtes) Allel. Das demethylierte Allel wird für gewöhnlich exprimiert, während das methylierte Allel für die Transkription stillgelegt ist. Für die vier in dieser Arbeit untersuchten iDMRs zeigte nur *PEG3* das erwartete schwarz-weiß Prägungsmuster. Mit 1,5 % für das maternale (geprägte) Allel und 3,4 % für das paternale (nicht geprägte) Allel waren die Epimutationsraten für beide elterlichen Allele niedrig. Epimutationen wurden dabei als Allel-Methylierungsfehler mit über 50 % aberrant (de)methylierten CpG Stellen definiert. Überraschenderweise wich das Prägungsmuster für zwei andere Loci erheblich von dem erwarteten Dogma ab. Für die väterlich geprägte *MEG3* IG-DMR und den mütterlich geprägten *MEST* Promotor waren die Epimutationsraten des unmethylierten Allels (13,6 % und 18,6 %) beides Mal erheblich höher als die des methylierten Allels (3,1 % und 1,8 %). Die große Anzahl an epimutierten Allelen erklärt auch die daraus entstehende Hypermethylierung des nicht-geprägten Allels (21,1% für die *MEG3* IG-DMR, 22,3 % für *MEST* statt den erwarteten 0 % Methylierung), hier erstmals als HNA-Effekt deklariert [242]. Die geprägten (methylierten) Allele waren dagegen für beide Gene erwartungsgemäß hoch methyliert mit 95,7 % für *MEST* und 95,5 % für die *MEG3* IG-DMR. Der HNA-Effekt zeigte eine hohe Varianz zwischen verschiedenen Individuen. Es ist bekannt, dass sich interindividuelle Unterschiede in der Zellzusammensetzung eines Gewebes auch auf die Methylierung

auswirken können. Jedoch erklärt dies nicht die hier beobachtete Reichweite von 2 % - 66 % HNA. Die GS Junior Daten bestätigen den HNA-Effekt in allen drei untersuchten somatischen Geweben. Experimentelle oder bioinformatische Artefakte können folglich weitgehend ausgeschlossen werden, da der Effekt mit zwei unabhängigen Library-Anfertigungsprotokollen und NGS Sequenzierungsplattformen nachgewiesen wurde und damit hoch konsistent war. Im GS Junior zeigte sich eine HNA mit 23,0 %, 30,0 %, 29,5 % für die *MEG3* IG-DMR und für *MEST* mit 21,7 %, 15,1 % und 11,1 % in Nabelschnurblut, adultem Blut und Viszeralfett. Aus den Ergebnissen kann demnach geschlossen werden, dass die HNA nicht primär vom parentalen Allel-Ursprung abhängt (einmal ist das maternale Allel betroffen, einmal das paternale Allel) und dass es sich um einen generellen Zustand handelt, der in allen somatischen Geweben eines Individuums herrscht. Für die sekundäre *MEG3* Promotor DMR wurde ein intermediäres Muster festgestellt. Zwar war die Epimutationsrate des demethylierten Allels signifikant höher als die Epimutationsrate des methylierten Allels (5,6 % zu 1,0 %), aber die HNA war mit 9,0 % deutlich niedriger als für die beiden anderen bereits beschriebenen Loci. Die Epimutationsraten der somatischen Gewebe zeigten für das unmethylierte Allel generell eine sehr hohe interindividuelle Varianz (variierend von 0 % - 66 %). In Spermien waren die Epimutationsraten sehr niedrig mit 0,5 % für *MEST* und 0,9 % für die *MEG3* IG-DMR. Mit einem Spektrum von 0 % bis 10 % war auch die Varianz zwischen den Individuen hier deutlich geringer. Spermien repräsentieren die väterliche Linie und wurden deshalb mit dem paternalen Allel von somatischen Geweben verglichen. Mit 2,5 % Durchschnittsmethylierung für *MEST* konnte in Spermien keine HNA gefunden werden. Da die *MEG3* IG-DMR mütterlich exprimiert wird, müsste man für den HNA-Effekt in der mütterlichen Linie eigentlich Oozyten untersuchen. Da diese deutlich schwerer zugänglich sind als Spermien, konnte hier leider kein solches Experiment durchgeführt werden. Geuns et al. führten ebenfalls Plasmid Studien am *MEG3* IG-DMR Locus in humanen Keimzellen durch und fanden klassische Methylierungsprofile für Oozyten (vollständige Methylierung) und für Spermien (vollständige Demethylierung) [247]. Unsere Ergebnisse bezüglich der Spermien-Methylierung (94,7 %) stimmen mit dieser Publikation überein. Die stabilen keimbahnspezifischen Muster wurden bis ins zweite Teilungsstadium aufrechterhalten. Danach wurden auch intermediäre Profile gemessen (26 – 74 %) die auch in Amniozyten und fetalem/adultem Blut auftraten und auf eine weniger strenge Prägungskontrolle hinweisen [247]. In der Studie wurden die beiden parentalen Allele leider nicht

unterschieden und es wurden auch keine Epimutationsraten berechnet, aber es ist anzunehmen, dass die meisten intermediären Muster auf hypermethylierte mütterliche Allele (und damit auf einen HNA-Effekt) zurückzuführen sind. Intermediäre Methylierungswerte zeigen grundsätzlich immer Durchschnittswerte aus mehreren Zellen/Zelltypen/CpGs an. Ein einzelnes Allel kann an einer CpG-Stelle nur entweder methyliert (100 %) oder nicht methyliert (0 %) sein. In einer für die Expression funktionell relevanten DMR würde eine HNA von über 50 % folglich implizieren, dass die Mehrheit der Zellen mit zwei methylierten Allelen ausgestattet ist, die Expression in diesen Zellen damit vollständig inhibiert und im Gewebe an sich somit ebenfalls deutlich reduziert ist. Der HNA-Effekt ist also auch als loss/relaxation of imprinting (LOI/ROI) Effekt zu bewerten, da das strikte Prägungsmuster zumindest teilweise aufgehoben wird und sich die Methylierung der beiden elterlichen Allele aneinander angleicht. Wenn das erwartungsgemäß geprägte methylierte Allel von LOI/ROI betroffen (also hypomethyliert) ist, indiziert das eine biallelische Expression beider parentaler Allele in einer Region, die als iDMR normalerweise durch eine monoallelische Expression charakterisiert ist. Für *IGF2* wurde bereits eine solche biallelische LOI Transkription im Blut von 10 - 20 % der untersuchten gesunden Individuen gefunden. Auch hier war der Effekt durch von einer hohen epigenetischen Heterogenität und einer enormen interindividuellen Varianz geprägt [305, 306]. Der LOI/ROI Effekt war jedoch sowohl genspezifisch als auch gewebespezifisch (in Plazentagewebe war z. B. keine biallelische Expression zu finden). LOI/ROI tritt demnach wahrscheinlich erst nach der Embryogenese auf. Erstaunlicherweise wurden alle diese wachstumsregulierenden geprägten Gene in mehreren Organen/Geweben während der postnatalen Wachstumsverlangsamung transkriptionell herunter reguliert [307]. Die HNA könnte daher auch Teil eines physiologischen Prozesses zur Limitierung der Körpergröße/des Körpergewichts durch eine koordinierte Herunterregulation der Expression geprägter Gennetzwerke sein. In Darmkrebs-Patienten wurde schon früh eine biallelische *IGF2* Expression in Blut und Darmschleimhaut festgestellt [308, 309], weshalb LOI/ROI-induzierte Aktivierung des reprimierten Allels in der Vergangenheit oftmals in Verbindung mit Krebsprädisposition untersucht wurde [120, 121, 123, 310-312]. LOI/ROI Effekte zeigen insgesamt eine große epigenetische Heterogenität hinsichtlich der Effektgröße, den Auswirkungen auf das Transkriptionsniveau, der betroffenen Gene/Gewebe und wurde sowohl bei Krebspatienten als auch bei gesunden Individuen gefunden. Auffällig ist jedoch,

dass in der Literatur bisher fast nur LOI/ROI-Effekte beschrieben wurden, bei denen eine Hypomethylierung des geprägten Allels und eine biallelische Expression beobachtet wurden. In dieser Arbeit wurde jedoch erstmalig eine humane LOI/ROI in die gegensätzlichen Richtung, nämlich eine Hypermethylierung des nicht geprägten Allels (HNA) festgestellt, die zur epigenetischen transkriptionellen Stilllegung des normalerweise unmethylierten aktiven Allels führen sollte. Dies trat in zwei somatischen Geweben (Fettgewebe und Blut) zutage, allerdings nicht in Gameten. Wir konnten keine signifikante Zu- oder Abnahme der HNA mit dem Alter feststellen, Nabelschnurblut und adultes Blut zeigten vergleichbar viele abnormal methylierte Allele. Deshalb kann vermutet werden, dass die HNA kongenital vorhanden ist bzw. zwischen der Embryogenese und der Fetogenese erworben wird, bevor die drei Keimblätter entstehen und die Gewebedifferenzierung beginnt. Die HNA ist unabhängig von der genspezifischen parentalen Herkunft (für *MEST* war das paternale Allel betroffen, für *MEG3* das maternale Allel) und einige Loci scheinen sehr HNA-suszeptibel zu sein, andere dagegen gar nicht (z.B. *PEG3*). RNA-Studien, die den HNA-Effekt auch auf Expressionsebene beweisen, wären wünschenswert. In Mäusen wurde schon mal eine *IGF2*-Hypermethylierung verbunden mit einem Gen-Silencing in verschiedenen Geweben festgestellt [313]. Im Gegensatz zu der „klassischen LOI/ROI“, bei der das methylierte Allel zusätzlich angeschaltet (hypomethyliert) wird und man eine biallelische Expression erwartet, was man mittels quantification of allele-specific expression by pyrosequencing (QUASEP) leicht nachweisen könnte [314], ist der HNA-Effekt auf Expressionsebene deutlich schwieriger zu validieren, da dieser nur die Dosis der monoallelischen Expression beeinflussen würde. Bestenfalls würde man deshalb eine Untersuchung der HNA-Auswirkung mittels Einzelzell-RNA Sequenzierung durchführen. Leider war für unsere Proben kein Ausgangsmaterial mehr für eine solche Studie verfügbar. Nur für eine Subgruppe der VAT-Proben konnte für *MEST* (20 Proben) und für *MEG3* (7 Proben) eine normale qRT-PCR gemacht werden. Da kein informativer SNP in der Zielregion war, konnte hierbei nicht zwischen den beiden elterlichen Allelen unterschieden werden. Für *MEG3* entsprachen die Expressionsdaten der Erwartung einer transkriptionellen Gen-Stilllegung mit zunehmender HNA. Aufgrund der zu niedrigen Probenzahl konnte allerdings keine statistische Signifikanz erreicht werden. *MEST* zeigte allerdings entgegen der Erwartung eine positive Korrelation zwischen der Methylierung und der Expression. Das lässt eine komplexere *MEST* Regulierung im VAT vermuten. Das Methylierungsniveau der untersuchten Promotor DMR ist wahrscheinlich nicht der primäre

Mechanismus über den die *MEST* Expression der untersuchten Transkript-Variante (Isoform) im Fettgewebe gesteuert wird [315]. Für den Menschen sind zwei unterschiedliche Promotoren für das *MEST*-Gen bekannt, die unterschiedliche Isoformen mit alternativen ersten Exons generieren. Der in dieser Arbeit untersuchte Promotor kontrolliert die monoallelische Expression der Isoform 1. Die Isoform 2 steht dagegen unter der Kontrolle des zweiten Promotors und wird biallelisch exprimiert [315, 316]. In verschiedenen adulten Tumorgeweben wurde eine erhöhte *MEST* Expression [317] und ein LOI festgestellt, der auf ein Umschalten des Promotors zurückzuführen ist [199, 318]. Im eigenen Expressionsversuch wurde die Expression der Isoform 2 untersucht, da sich Isoform 1 leider nicht amplifizieren lies. Isoform 1 wäre jedoch deutlich aussagekräftiger gewesen. Außerdem war die *MEST* Expression ebenfalls positiv mit dem BMI der Probanden korreliert. Da der BMI innerhalb der Untersuchungsgruppe stark variierte (von 20,8 bis 53,6 kg/m²) und *MEST* in der Literatur klar mit Adipositas assoziiert ist (siehe Kapitel 4.2.3 HNA in geprägten Genen auf Seite 149) könnte der BMI als Confounding-Faktor den HNA-Effekt zusätzlich maskieren. Außerdem scheint es für *MEST* ein sense und ein antisense Transkript zu geben [319]. Kim et al. beschrieben 2015 DNA-Methylierungsdifferenzen zwischen Tumorgewebe und normalem Gewebe, die ebenfalls eine positive Korrelation mit der Expression zeigten [319]. Die in der Kim et al. Studie untersuchte *MEST* ICR lag nur 1,2 kb von der hier untersuchten DMR entfernt und fungiert wahrscheinlich als Promotor des antisense Gens. Deshalb ist es naheliegend, dass die HNA entsprechend die Expression dieses Transkripts verringert. Damit wäre sie indirekt verantwortlich für die Hochregulierung des sense Transkripts, was den hier (und bei Kim et al.) nachgewiesenen Effekt erklären könnte. Die Expressionsdaten müssen deshalb mit Vorsicht interpretiert werden und sind aufgrund einer möglicherweise ungünstigen Gewebeauswahl, der falschen untersuchten Isoform, einer niedrigen Probenzahl und sense versus antisense Transkript-Effekten, wahrscheinlich nicht repräsentativ um den HNA-Effekt zulänglich zu beschreiben.

4.2.3 HNA in geprägten Genen

Der HNA-Effekt äußerte sich am stärksten im *mesoderm-specific transcript (MEST)*, auch bekannt als *paternally expressed gene 1 (PEG1)*, welches auf Chromosom 7q32 lokalisiert ist und zu der alpha/beta Hydrolase Superfamilie gehört [320]. In zahlreichen Geweben wurde

eine (pränatale sowie postnatale) monoallelische Expression/Prägung dieses Locus festgestellt [316, 321, 322]. *MEST* spielt eine Rolle bei Übergewicht und Adipositas [195, 323] und ist wichtig für die Entstehung und Differenzierung von Fettgewebe [320, 324]. Im Fettgewebe fettleibiger Mäuse und Menschen wurde vermehrt die geprägte Isoform 1 gefunden [315, 321]. Die Expressionslevel korrelierten dabei mit der Expansion der Fettmasse [320, 324-326]. Murine *Mest* Knockout Studien zeigen eine Wachstumsretardierung des Fötus und der Plazenta mit niedrigeren Überlebensraten der Nachkommen sowie verändertem mütterlichen Verhalten [327]. Diese Ergebnisse zusammengenommen machen *MEST* zu einem interessanten Ziel für die Erforschung der metabolischen Programmierung und einem guten GDM-Kandidaten. Eine reduzierte *MEST*-Expression könnte eine variable und individuelle Vorbeugung gegen Diät-induziertes Übergewicht bedeuten.

Das zweite mütterlich geprägte Gen, paternally expressed gene 3 (*PEG3*), befindet sich auf Chromosom 19q13 und teilt sich einen gemeinsamen Promotor und mehrere 5' Exons mit zinc finger imprinted 2 (*ZIM2*) [328]. *Peg3* gehört zu der Krüppel C2H2-Typ Zinkfinger-Familie [329]. Es sind einige Transkript-Varianten bekannt, die über alternatives Spleißen zu verschiedenen Isoformen führen können [330]. Der in dieser Arbeit untersuchte *PEG3*-Locus zeigte sehr niedrige Epimutationsraten für beide elterlichen Allele (im Gegensatz zu *PEG1/MEST*). Für beide Gene ist eine Hypomethylierung des Nabelschnurblutes allerdings mit paternaler Fettleibigkeit assoziiert [323]. Es gibt Hinweise, dass *PEG3* als Mediator in p53-vermittelte Zelltod- und Proliferations-Signalwege involviert ist [331] und darüber hinaus als Tumorsuppressor agiert. Eine Herunterregulierung von *Peg3* über die Promotor-Methylierung wurde in einigen Krebsarten festgestellt [319, 332, 333]. Weitere Funktionen von *PEG3* liegen bekanntermaßen innerhalb der Regulation des Essverhaltens, Adipositas sowie metabolischer Prozesse [323, 334].

Das maternally expressed gene 3 (*MEG3*) oder gene trap locus 2 (*GTL2*) ist auf dem Chromosom 14q32 angesiedelt, innerhalb des *DLK1-MEG3* Locus. Im Gegensatz zu *MEG3* (paternal geprägt) ist das delta like non-canonical notch ligand 1 (*DLK1*) Gen paternal exprimiert und maternal geprägt. Ähnlich wie *H19* und *IGF2* sind auch *DLK1* und *MEG3* ein Beispiel für die koordinierte Kontrolle verbundener geprägter Gene [335]. *DLK1* kodiert ein Transmembranprotein welches in die Karzinogenese und die Adipozyten-Differenzierung involviert ist [336, 337]. Bedingt durch alternatives RNA-Spleißen sind mindestens 12

verschiedene, nicht-kodierende *MEG3*-Transkripte bekannt [338] und eine große Anzahl an microRNAs (miRNAs) und small nucleolar RNAs (snoRNAs) [339]. In Zellkultur agieren nicht-kodierende *MEG3*-RNAs als Wachstums-Suppressoren, wahrscheinlich über eine p53-Aktivierung [340-342]. Im *DLK1-MEG3* Locus liegen zwei ICRs (siehe Abbildung 48), die primäre *MEG3* IG-DMR, die 13 kb upstream der transcription start side (TSS) liegt und eine mit dem Promotor überlappende, sekundäre DMR, die *MEG3* DMR oder *MEG3* Promotor DMR [343]. Diese beiden DMRs kontrollieren die Prägung des *DLK1-MEG3* Locus. Generell ist die Weitergabe Keimbahn-spezifischer DNA-Methylierungsmuster und die Aufrechterhaltung Allel-spezifischer epigenetischer Profile im somatischen Gewebe als eine der Hauptaufgaben von ICRs angesehen [75]. Selbst kleinste Veränderungen der DNA Methylierung von ICRs können deshalb große globale Effekte auf die Prägung der dazugehörigen Domänen/Gene haben [75, 85, 344]. Dennoch geht man davon aus, dass sie besonders suszeptibel für genetische und epigenetische Veränderungen sind und aus diesem Grund auch in der menschlichen Tumorgenese eine sehr hohe epigenetische Instabilität aufweisen, da das inaktivierte Allel mit einem natürlichen „one hit“ gleichzusetzen ist [319]. Für den *DLK1-MEG3* Locus ist bekannt, dass Hypermethylierungen einer oder beider DMRs die Expression des maternalen Transkripts vermindert [345]. In Kim et al. wurde beschrieben, dass eine Hypermethylierung zwischen primärem Tumor- und normalem Gewebe der *MEG3* IG-DMR (6 kb downstream vom hier untersuchten Assay entfernt) und der *MEG3* Promotor DMR (98 bp upstream vom hier untersuchten Assay entfernt) in einer Verminderung der *MEG3* Expression resultierte [319]. Die in dieser Studie generierten Expressionsdaten für VAT sind konform mit den vorangegangenen Studien, wenngleich sie aufgrund einer zu niedrigen Probenzahl (n = 7) statistisch nicht signifikant waren. Das Prägungsprofil von primären DMRs wird während der Gametogenese etabliert, das von sekundären DMRs nach der Befruchtung. Die primäre Keimbahn IG-DMR fungiert als upstream Regulierer der sekundären Promotor DMR [247]. Geuns et al. deklarierten, ein strikt differentiell methyliertes Profil der IG-DMR sei während der Gametogenese elementar wichtig für die Generierung eines korrekten Prägungsmusters benachbarter DMRs im *DLK1-MEG3* Cluster wie z.B. der *MEG3* Promotor DMR. Sobald dieses jedoch erfolgreich erworben wurde, wird die IG-DMR redundant und die differenzielle Methylierung aus diesem Grund nicht mehr aktiv aufrecht gehalten [247]. Diese Annahme könnte auch die beobachtete HNA und die hohen Epimutationsraten des unmethylierten mütterlichen Allels erklären. In einigen

Tumoren wurde jedoch auch eine verringerte *MEG3*- bzw. *DLK1*-Expression gefunden, vermutlich bedingt durch eine Hypermethylierung der IG-DMR [319, 330, 337, 342, 346]. Die HNA könnte demnach auch ein Zeichen für eine erhöhte Krebs-Suszeptibilität der betroffenen Individuen sein oder sogar als Biomarker für die Krebsdetektion dienen. Kim et al. verglich 2015 die DNA-Methylierung und korrespondierende Expression einiger bekannter geprägter Gene (sowie einiger Krebs-Gene) in normalem und korrespondierendem Tumorgewebe von Individuen mit verschiedene Krebsarten. Für die Mehrheit der geprägten Gene wurde eine Hypermethylierung und daraus folgend eine Herunterregulation der Genexpression festgestellt (so auch für *MEG3* und *PEG3*). *MEST* kam eine Sonderrolle zu aufgrund eines antisense/sense Wechselspiels. Allgemein zeigten die geprägten Gene in dieser Studie deutlich mehr Aberrationen als Krebs-assoziierte Gene. Ihre Funktion in der Tumorgenese ist zwar noch unbekannt, erinnerte jedoch mehr an Tumorsuppressorgene als an Onkogene [319].

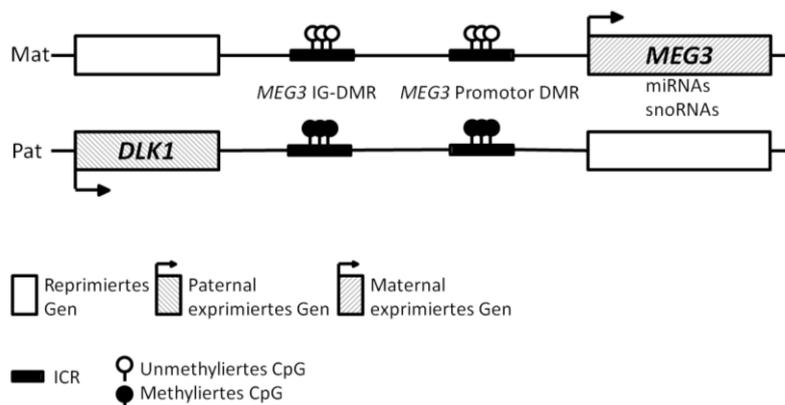


Abbildung 48: Schematische Darstellung der Prägung des *DLK1-MEG3* Locus

MEG3 und *DLK1* sind reziprok geprägte coexprimierte Gene. Die beiden maternal exprimierten DMRs *MEG3* IG-DMR und *MEG3* Promotor DMR fungieren als ICRs. *MEG3* kodiert für eine untranslatierte RNA.

Mat: maternales Allel; Pat: paternales Allel; ICR: imprinting control region; miRNA: micro-RNA; snoRNA: small nucleolar ribonucleic acid.

4.2.4 Metastabile Epiallele (ME) und Entwicklungsprogrammierung

Während der Embryogenese und der neonatalen Entwicklung ist das Epigenom sehr beeinflussbar durch Umweltfaktoren und dadurch auch anfälliger für Fehlregulierungen resultierend aus nachteiliger Exposition, beispielsweise durch ungesunden mütterlichen Lebensstil [169, 170] oder assistierter Reproduktion (ART) [10, 19, 347]. In der frühen

Entwicklung werden auch die Methylierungsmuster etabliert und die DNA-Syntheseraten sind generell sehr viel höher als in der Adoleszenz [17]. Geprägte Gene entgehen der epigenomweiten Reprogrammierungswelle nach der Befruchtung und sind funktionell haploid. Aus diesem Grund sind sie nochmal empfindlicher für die Einwirkung von Umwelteinflüssen. Auf den ersten Blick überraschen die in dieser Arbeit beschriebenen beachtlichen Epimutationsraten und besonders die enorme interindividuelle Varianz innerhalb von iDMRs, die normalerweise somatisches Wachstum kontrollieren (*MEST* und *MEG3*). Um eine differenzielle elterliche DNA-Methylierung in ICRs über viele Zellteilungen hinweg aufrechtzuerhalten, braucht es jedoch aktive Mechanismen, die das unmethylierte parentale Allel gegen *de novo* Methylierung schützen. Im *H19-IGF2* Locus wird dies über die Bindung von CTCF Zinkfingerproteinen an das unmethylierte Allel gewährleistet [348, 349]. Histon-Proteine scheinen in diesem Kontext ebenfalls eine Rolle zu spielen, da auf dem unmethylierten Allel eine Anreicherung von H3K4me2 und H3K4me3 festgestellt wurde. Diese Akkumulation könnte dazu dienen, die Bindung von DNA-Methyltransferasen (DNMTs) an das Chromatin zu verhindern. Darüber hinaus werden überzählige inkorrekt gebundene DNA-Methylgruppen von Enzymen der ten-eleven translocation (TET) Proteinfamilie nachträglich wieder entfernt [350]. Um Prägungsmuster aktiv aufrecht zu halten, interagieren folglich mehrere verschiedene Faktoren miteinander, deren Mechanismen und Wechselwirkungen zum jetzigen Zeitpunkt nur unzureichend verstanden sind. In diesem komplexen Zusammenspiel kann es sowohl durch Umwelt-induzierte als auch durch stochastische Fehler zu einer HNA kommen. In einigen Aspekten ähneln sich HNA und metastabile Epiallele (MEs). MEs sind definiert als Allele, die eine variable Expressivität bei genetischer Homogenität zeigen. Genetisch identische Individuen zeigen demnach eine phänotypische Variation aufgrund epigenetischer Unterschiede, entstanden durch eine variable Exposition gegenüber Umwelteinflüssen in der frühen Entwicklung [17, 351, 352]. Das unmethylierte Allel für *MEST* und *MEG3* IG-DMR zeigte eine sehr hohe interindividuelle Variabilität und erinnerte damit an MEs. Leider konnte in dieser Studie die HNA mit keinem eindeutigen Phänotyp verknüpft werden. Beide Untersuchungsgruppen (GDM und Nicht-GDM) enthielten sowohl starke als auch schwache HNA-Proben und zeigten nur geringe, schwach signifikante Unterschiede in der Durchschnittsmethylierung ohne Allel-Separation für die Gene *MEG3* Promotor ($p = 0,011$), *MEST* ($p = 0,035$) und *PEG3* ($p = 0,037$) für die Illumina MiSeq Daten. Auf Epimutationsebene wurden keine signifikanten Unterschiede

detektiert. Auch mit allen anderen vorhandenen klinischen Parametern wurden Korrelationen vorgenommen, aber keine überzeugenden Verbindungen gefunden. Die berühmtesten Beispiele für MEs sind die murinen *axin fused* ($Axin^{Fu}$) und *agouti viable yellow* (A^{vy}) Allele. Der $Axin^{Fu}$ Phänotyp reicht von einem vollkommen unauffälligen bis hin zu einem stark geknickten Schwanz, abhängig vom $Axin^{Fu}$ -Methylierungszustand [351]. Bei A^{vy} Mäusen variiert die Fellfarbe von wildtypischem pseudoagouti, über ein geflecktes Muster bis hin zu einfarbigem gelb. Die gelbe Fellfarbe korreliert außerdem mit einer Prädisposition für Adipositas, metabolischen Störungen und Krebs [353, 354]. Die Methylierung des in den Locus eingebauten transposablen intracisternal A-particle (IAP) Elements bedingt den Phänotyp der Mäuse (methyliert: pseudoagouti, unmethyliert: gelb, Mosaik: gefleckt). Über eine Methylsupplementierung der mütterlichen Nahrung mit Cholin, Betain, Vitamin B₁₂ und extra Folsäure kann der Krankheits-Phänotyp der Nachkommen komplett aufgehoben werden. MEs sind demnach als epigenetische Biosensoren für Umwelteinflüsse wie z.B. die Ernährungszusammensetzung der Mutter während der Schwangerschaft zu sehen [17]. Es scheinen insgesamt mehr MEs zu existieren als ursprünglich weitläufig angenommen wurde und auch der Menschen besitzt MEs, die die phänotypische Diversität und Komplexität mitbestimmen [355]. Die epigenetische Programmierung von MEs durch Umweltstimuli könnte eine unterschätzte Rolle in der Entstehung vieler Volkskrankheiten spielen und sollte im Kontext der developmental origins of health and disease (DOHAD) Forschung weiter untersucht werden.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

In Übereinstimmung mit der Literatur zeigt auch diese Doktorarbeit, dass Schwangerschaftsdiabetes eine Reihe von Veränderungen im Methylohm von GDM-Kindern verglichen mit Nicht-GDM-Kindern induziert. Da die DNA-Methylierung bekanntermaßen eine essentielle Rolle in der Genregulation spielt [9, 50, 53] (Methylierungsveränderungen manifestieren sich auch auf der Expressionsebene), kann davon ausgegangen werden, dass die hier beschriebenen GDM-Effekte in die erhöhte Krankheitssuszeptibilität der Nachkommen für metabolische Erkrankungen involviert sind. Um die Persistenz der Methylierungsdifferenzen und Epimutationsraten vom Neugeborenen bis hin zum Erwachsenen bzw. alten Menschen zu untersuchen, wären Längsschnittstudien derselben

Individuen (bestenfalls gut charakterisierter Mutter-Kind Tandems) wünschenswert. Um weitere pharmakologische, ernährungs- oder verhaltensbedingte Auswirkungen des mütterlichen Lebensstils auf das Kind zu finden, müssten zum einen die Untersuchungsgruppen noch sorgfältiger beschrieben werden (z.B. auch hinsichtlich des Stillverhaltens, Sport, etc.) und zum anderen insgesamt größere Probenzahlen untersucht werden, damit die statistische Power erhöht und noch kleinere Effekte sichtbar werden. Langfristig ist das nur über Metaanalysen verschiedener genomweiter Studien möglich oder über das Zusammenlegen vieler kleinerer GDM-Probensammlungen und der Durchführung einer gemeinsamen großen Studie. GDM scheint insgesamt eine multifaktoriell bedingte Krankheit zu sein, deren epigenetische Auswirkungen viele Gene, jedoch mit einer vergleichsweise niedrigen Effektgröße, betreffen. Viele Krankheiten bzw. phänotypischen Merkmale zeigen keine einfachen dominant-rezessiven Ursachen, sondern sind multifaktoriell bedingt und entstehen durch ein Zusammenspiel vieler kleiner epigenetischer DNA-Methylierungsveränderungen. Obwohl schon viel über die Anzahl geprägter Gene und über epigenetische Imprinting-Mechanismen bekannt ist, bleiben noch einige Fragen offen hinsichtlich der genauen funktionellen Interaktionen geprägter Gencluster und komplexer, zugrundeliegender, entwicklungsabhängiger Steuerungsprozesse. Manche geprägte Cluster (wie *IGF2* und *IGF2R*) sind gut beschrieben, andere (wie *MEG3* und *DLK1*) dagegen aktuell noch deutlich schlechter charakterisiert. Um weitere epigenetisch labile Zielgene/Zielregionen im menschlichen Genom zu finden, die entscheidend für die Ätiologie chronischer Krankheiten sein könnten, ist deshalb die stetige Optimierung und Entwicklung neuer technischer sowie bioinformatischer Tools unabdingbar. Bisher ermöglicht z.B. keine Technik ein single molecule tagging (SMT) für Amplikon-Sequenzierungen, mit dem ein Amplifikationsbias definitiv ausgeschlossen bzw. gegebenenfalls nachträglich herausgerechnet werden könnte. Die in dieser Arbeit verwendeten, teilweise selbst etablierten NGS-DBS Techniken, sind vergleichsweise neu und erlauben tiefgreifende und hochauflösende Einblicke in allgemeine Prägungsmechanismen, da die beiden parentalen Allele unterscheidbar gemacht werden können. Die Ergebnisse zeigen dadurch aber auch, dass Prägungsmuster in der Realität deutlich vielschichtiger und komplexer sind, als die geläufige Lehrbuchmeinung derzeit noch annimmt und ein Schwarz-Weiß-Methylierungsmuster nur für manche geprägten Gene zutrifft bzw. dieses entwicklungsbedingten Änderungen unterliegt. Die dynamische und relativ variable Natur

geprägter Gen-Aktivität und Repression kann nur unzureichend mit korrespondierenden Phänotypen assoziiert werden. Metastabile Epiallele scheinen in diesem Kontext ebenfalls eine bisher unterschätzte wichtige Rolle zu spielen. Auch innerhalb der gesunden Bevölkerung könnten sie wesentlich zur phänotypischen Komplexität beisteuern. Dahingehend sollten in Zukunft deutlich umfangreichere LOI/ROI- und HNA-Studien durchgeführt werden, die am besten alle 50 - 100 human geprägten Genen abdecken und ab der Keimbahn bis ins hohe Alter sowohl unterschiedliche Gewebetypen als auch verschiedene Differenzierungsstadien umfassen. Um außerdem die Rolle normaler und von der Norm abweichender Umweltbedingungen einschätzen zu können, wären Mausstudien unter definierten Laborbedingungen hilfreich zur Reduktion von Störfaktoren, die in allen humanen Untersuchungskohorten aufgrund individuell sehr unterschiedlicher Lebensstile nicht ausgeschlossen werden können.

5 Referenzen

5.1 Literaturverzeichnis

1. Janning, W. and E. Knust, *Genetik: Allgemeine Genetik-Molekulare Genetik-Entwicklungsgenetik*. 2008: Georg Thieme Verlag.
2. Waddington, C.H., *The epigenotype. 1942*. Int J Epidemiol, 2012. **41**(1): p. 10-3.
3. Egger, G., et al., *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 457-63.
4. Feinberg, A.P. and R.A. Irizarry, *Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Stochastic epigenetic variation as a driving force of development, evolutionary adaptation, and disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107** Suppl 1: p. 1757-64.
5. Bernstein, B.E., A. Meissner, and E.S. Lander, *The mammalian epigenome*. Cell, 2007. **128**(4): p. 669-81.
6. Tollefsbol, T., *Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics*. 2010: Elsevier Science.
7. Hammoud, S.S., B.R. Cairns, and D.T. Carrell, *Analysis of gene-specific and genome-wide sperm DNA methylation*. Methods Mol Biol, 2013. **927**: p. 451-8.
8. Bennett-Baker, P.E., J. Wilkowski, and D.T. Burke, *Age-associated activation of epigenetically repressed genes in the mouse*. Genetics, 2003. **165**(4): p. 2055-62.
9. Jaenisch, R. and A. Bird, *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. Nat Genet, 2003. **33** Suppl: p. 245-54.
10. El Hajj, N. and T. Haaf, *Epigenetic disturbances in in vitro cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction*. Fertil Steril, 2013. **99**(3): p. 632-41.
11. Petronis, A., *Epigenetics as a unifying principle in the aetiology of complex traits and diseases*. Nature, 2010. **465**(7299): p. 721-7.
12. Atsem, S., et al., *Paternal age effects on sperm FOXP1 and KCNA7 methylation and transmission into the next generation*. Hum Mol Genet, 2016.
13. Hitchins, M.P., et al., *Dominantly inherited constitutional epigenetic silencing of MLH1 in a cancer-affected family is linked to a single nucleotide variant within the 5'UTR*. Cancer Cell, 2011. **20**(2): p. 200-13.
14. Chong, S. and E. Whitelaw, *Epigenetic germline inheritance*. Curr Opin Genet Dev, 2004. **14**(6): p. 692-6.
15. Goyal, R., R. Reinhardt, and A. Jeltsch, *Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(4): p. 1182-8.
16. Schneider, E., et al., *Spatial, temporal and interindividual epigenetic variation of functionally important DNA methylation patterns*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(12): p. 3880-90.
17. Dolinoy, D.C., et al., *Metastable epialleles, imprinting, and the fetal origins of adult diseases*. Pediatr Res, 2007. **61**(5 Pt 2): p. 30R-37R.
18. Haertle, L., et al., *Epigenetic signatures of gestational diabetes mellitus on cord blood methylation*. Clin Epigenetics, 2017. **9**: p. 28.
19. El Hajj, N., et al., *DNA methylation signatures in cord blood of ICSI children*. Hum Reprod, 2017: p. 1-9.

20. Tomizawa, S., J. Nowacka-Woszek, and G. Kelsey, *DNA methylation establishment during oocyte growth: mechanisms and significance*. *Int J Dev Biol*, 2012. **56**(10-12): p. 867-75.
21. Shuli, L., Z. Shengli, and Y. Ying, *Research progress of regulatory mechanism of DNA methylation in complex traits using monozygotic twins*. *Yi Chuan*, 2016. **38**(12): p. 1043-1055.
22. Segal, N.L., et al., *Identical twins doubly exchanged at birth: a case report of genetic and environmental influences on the adult epigenome*. *Epigenomics*, 2017. **9**(1): p. 5-12.
23. El Hajj, N., et al., *Limiting dilution bisulfite (pyro)sequencing reveals parent-specific methylation patterns in single early mouse embryos and bovine oocytes*. *Epigenetics*, 2011. **6**(10): p. 1176-88.
24. Reik, W., W. Dean, and J. Walter, *Epigenetic reprogramming in mammalian development*. *Science*, 2001. **293**(5532): p. 1089-93.
25. Wang, Y., et al., *Functional CpG methylation system in a social insect*. *Science*, 2006. **314**(5799): p. 645-7.
26. Auclair, G. and M. Weber, *Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals*. *Biochimie*, 2012. **94**(11): p. 2202-11.
27. Marhold, J., et al., *The Drosophila MBD2/3 protein mediates interactions between the MI-2 chromatin complex and CpT/A-methylated DNA*. *Development*, 2004. **131**(24): p. 6033-9.
28. Yoder, J.A., C.P. Walsh, and T.H. Bestor, *Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites*. *Trends Genet*, 1997. **13**(8): p. 335-40.
29. Orłowski, J. and J.M. Bujnicki, *Structural and evolutionary classification of Type II restriction enzymes based on theoretical and experimental analyses*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(11): p. 3552-69.
30. de Koning, A.P., et al., *Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome*. *PLoS Genet*, 2011. **7**(12): p. e1002384.
31. Constancia, M., G. Kelsey, and W. Reik, *Resourceful imprinting*. *Nature*, 2004. **432**(7013): p. 53-7.
32. Tomizawa, S., et al., *Dynamic stage-specific changes in imprinted differentially methylated regions during early mammalian development and prevalence of non-CpG methylation in oocytes*. *Development*, 2011. **138**(5): p. 811-20.
33. Xie, W., et al., *Base-resolution analyses of sequence and parent-of-origin dependent DNA methylation in the mouse genome*. *Cell*, 2012. **148**(4): p. 816-31.
34. Lister, R., et al., *Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences*. *Nature*, 2009. **462**(7271): p. 315-22.
35. Jones, P.A., *The DNA methylation paradox*. *Trends Genet*, 1999. **15**(1): p. 34-7.
36. Mortusewicz, O., et al., *Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(25): p. 8905-9.
37. Song, J., et al., *Structure of DNMT1-DNA complex reveals a role for autoinhibition in maintenance DNA methylation*. *Science*, 2011. **331**(6020): p. 1036-40.
38. Boland, M.J., K.L. Nazor, and J.F. Loring, *Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation*. *Circ Res*, 2014. **115**(2): p. 311-24.
39. Goll, M.G. and T.H. Bestor, *Eukaryotic cytosine methyltransferases*. *Annu Rev Biochem*, 2005. **74**: p. 481-514.

40. Hata, K., et al., *Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice*. *Development*, 2002. **129**(8): p. 1983-93.
41. Meehan, R.R., *DNA methylation in animal development*. *Semin Cell Dev Biol*, 2003. **14**(1): p. 53-65.
42. Edwards, C.A. and A.C. Ferguson-Smith, *Mechanisms regulating imprinted genes in clusters*. *Curr Opin Cell Biol*, 2007. **19**(3): p. 281-9.
43. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. *Cell*, 1999. **99**(3): p. 247-57.
44. Nan, X., R.R. Meehan, and A. Bird, *Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2*. *Nucleic Acids Res*, 1993. **21**(21): p. 4886-92.
45. Du, Q., et al., *Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome*. *Epigenomics*, 2015. **7**(6): p. 1051-73.
46. Sved, J. and A. Bird, *The expected equilibrium of the CpG dinucleotide in vertebrate genomes under a mutation model*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(12): p. 4692-6.
47. Illingworth, R.S. and A.P. Bird, *CpG islands--'a rough guide'*. *FEBS Lett*, 2009. **583**(11): p. 1713-20.
48. Antequera, F., *Structure, function and evolution of CpG island promoters*. *Cell Mol Life Sci*, 2003. **60**(8): p. 1647-58.
49. Weber, M., et al., *Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome*. *Nat Genet*, 2007. **39**(4): p. 457-66.
50. Jones, P.A., *Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond*. *Nat Rev Genet*, 2012. **13**(7): p. 484-92.
51. Sadakierska-Chudy, A., R.M. Kostrzewa, and M. Filip, *A Comprehensive View of the Epigenetic Landscape Part I: DNA Methylation, Passive and Active DNA Demethylation Pathways and Histone Variants*. *Neurotoxicity Research*, 2015. **27**(1): p. 84-97.
52. Bird, A.P. and A.P. Wolffe, *Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin*. *Cell*, 1999. **99**(5): p. 451-4.
53. Vaissiere, T., C. Sawan, and Z. Herceg, *Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing*. *Mutat Res*, 2008. **659**(1-2): p. 40-8.
54. Mazzi, E.A. and K.F. Soliman, *Basic concepts of epigenetics: impact of environmental signals on gene expression*. *Epigenetics*, 2012. **7**(2): p. 119-30.
55. Esteller, M., *Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps*. *Nat Rev Genet*, 2007. **8**(4): p. 286-98.
56. Hon, G.C., et al., *Global DNA hypomethylation coupled to repressive chromatin domain formation and gene silencing in breast cancer*. *Genome Res*, 2012. **22**(2): p. 246-58.
57. Yan, X.J., et al., *Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia*. *Nat Genet*, 2011. **43**(4): p. 309-15.
58. Marmorstein, R., *Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(6): p. 422-32.
59. Bannister, A.J. and T. Kouzarides, *Regulation of chromatin by histone modifications*. *Cell Res*, 2011. **21**(3): p. 381-95.
60. Marmorstein, R. and R.C. Trievel, *Histone modifying enzymes: structures, mechanisms, and specificities*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1789**(1): p. 58-68.

61. Workman, J.L. and R.E. Kingston, *Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 545-79.
62. Linggi, B.E., et al., *Translating the histone code into leukemia*. J Cell Biochem, 2005. **96**(5): p. 938-50.
63. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
64. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
65. Cosgrove, M.S., *Histone proteomics and the epigenetic regulation of nucleosome mobility*. Expert Rev Proteomics, 2007. **4**(4): p. 465-78.
66. Fuks, F., et al., *DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity*. Nat Genet, 2000. **24**(1): p. 88-91.
67. Meissner, A., et al., *Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells*. Nature, 2008. **454**(7205): p. 766-70.
68. Okitsu, C.Y. and C.L. Hsieh, *DNA methylation dictates histone H3K4 methylation*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(7): p. 2746-57.
69. Smith, K.T. and J.L. Workman, *Histone deacetylase inhibitors: anticancer compounds*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(1): p. 21-5.
70. Gupta, S., et al., *Histone methylation regulates memory formation*. J Neurosci, 2010. **30**(10): p. 3589-99.
71. Wilkinson, L.S., W. Davies, and A.R. Isles, *Genomic imprinting effects on brain development and function*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(11): p. 832-43.
72. Hutter, B., V. Helms, and M. Paulsen, *Tandem repeats in the CpG islands of imprinted genes*. Genomics, 2006. **88**(3): p. 323-32.
73. Bartolomei, M.S. and S.M. Tilghman, *Genomic imprinting in mammals*. Annu Rev Genet, 1997. **31**: p. 493-525.
74. Weaver, J.R. and M.S. Bartolomei, *Chromatin regulators of genomic imprinting*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1839**(3): p. 169-77.
75. Bartolomei, M.S., *Genomic imprinting: employing and avoiding epigenetic processes*. Genes Dev, 2009. **23**(18): p. 2124-33.
76. Massah, S., T.V. Beischlag, and G.G. Prefontaine, *Epigenetic events regulating monoallelic gene expression*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2015. **50**(4): p. 337-58.
77. Luedi, P.P., et al., *Computational and experimental identification of novel human imprinted genes*. Genome Res, 2007. **17**(12): p. 1723-30.
78. Wilkins, J.F., *Genomic imprinting of Grb10: coadaptation or conflict?* PLoS Biol, 2014. **12**(2): p. e1001800.
79. Ideraabdullah, F.Y., S. Vigneau, and M.S. Bartolomei, *Genomic imprinting mechanisms in mammals*. Mutat Res, 2008. **647**(1-2): p. 77-85.
80. DeChiara, T.M., E.J. Robertson, and A. Efstratiadis, *Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene*. Cell, 1991. **64**(4): p. 849-59.
81. Barlow, D.P., et al., *The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus*. Nature, 1991. **349**(6304): p. 84-7.
82. Zemel, S., M.S. Bartolomei, and S.M. Tilghman, *Physical linkage of two mammalian imprinted genes, H19 and insulin-like growth factor 2*. Nat Genet, 1992. **2**(1): p. 61-5.
83. Wutz, A., et al., *Imprinted expression of the Igf2r gene depends on an intronic CpG island*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 745-9.
84. Reik, W. and J. Walter, *Genomic imprinting: parental influence on the genome*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(1): p. 21-32.

85. Bartolomei, M.S. and A.C. Ferguson-Smith, *Mammalian genomic imprinting*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(7).
86. Arnaud, P., *Genomic imprinting in germ cells: imprints are under control*. Reproduction, 2010. **140**(3): p. 411-23.
87. Barlow, D.P., *Genomic imprinting: a mammalian epigenetic discovery model*. Annu Rev Genet, 2011. **45**: p. 379-403.
88. Strogantsev, R. and A.C. Ferguson-Smith, *Proteins involved in establishment and maintenance of imprinted methylation marks*. Brief Funct Genomics, 2012. **11**(3): p. 227-39.
89. Robertson, K.D., *DNA methylation and human disease*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(8): p. 597-610.
90. Lin, S.P., et al., *Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the Dlk1-Gtl2 imprinted cluster on mouse chromosome 12*. Nat Genet, 2003. **35**(1): p. 97-102.
91. Thorvaldsen, J.L., K.L. Duran, and M.S. Bartolomei, *Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2*. Genes Dev, 1998. **12**(23): p. 3693-702.
92. Williamson, C.M., et al., *Identification of an imprinting control region affecting the expression of all transcripts in the Gnas cluster*. Nat Genet, 2006. **38**(3): p. 350-5.
93. Bajrami, E. and M. Spiroski, *Genomic Imprinting*. Open Access Maced J Med Sci, 2016. **4**(1): p. 181-4.
94. Li, J.Y., et al., *Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse*. Genomics, 2004. **84**(6): p. 952-60.
95. Hajkova, P., et al., *Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells*. Mech Dev, 2002. **117**(1-2): p. 15-23.
96. Popp, C., et al., *Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency*. Nature, 2010. **463**(7284): p. 1101-5.
97. Davis, T.L., et al., *The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(19): p. 2885-94.
98. Ueda, T., et al., *The paternal methylation imprint of the mouse H19 locus is acquired in the gonocyte stage during foetal testis development*. Genes Cells, 2000. **5**(8): p. 649-59.
99. Lucifero, D., et al., *Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(8): p. 839-49.
100. Moore, T. and D. Haig, *Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war*. Trends Genet, 1991. **7**(2): p. 45-9.
101. Tycko, B. and I.M. Morison, *Physiological functions of imprinted genes*. J Cell Physiol, 2002. **192**(3): p. 245-58.
102. Messerschmidt, D.M., B.B. Knowles, and D. Solter, *DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos*. Genes Dev, 2014. **28**(8): p. 812-28.
103. Dean, W., et al., *Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13734-8.
104. Haaf, T., *Methylation dynamics in the early mammalian embryo: implications of genome reprogramming defects for development*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **310**: p. 13-22.

105. Murphy, S.K. and R.L. Jirtle, *Imprinting evolution and the price of silence*. Bioessays, 2003. **25**(6): p. 577-88.
106. Smallwood, S.A. and G. Kelsey, *De novo DNA methylation: a germ cell perspective*. Trends Genet, 2012. **28**(1): p. 33-42.
107. Kinoshita, T., Y. Ikeda, and R. Ishikawa, *Genomic imprinting: a balance between antagonistic roles of parental chromosomes*. Semin Cell Dev Biol, 2008. **19**(6): p. 574-9.
108. Sha, K., *A mechanistic view of genomic imprinting*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008. **9**: p. 197-216.
109. Hore, T.A., R.W. Rapkins, and J.A. Graves, *Construction and evolution of imprinted loci in mammals*. Trends Genet, 2007. **23**(9): p. 440-8.
110. Reik, W., et al., *Regulation of supply and demand for maternal nutrients in mammals by imprinted genes*. J Physiol, 2003. **547**(Pt 1): p. 35-44.
111. Patten, M.M., et al., *The evolution of genomic imprinting: theories, predictions and empirical tests*. Heredity (Edinb), 2014. **113**(2): p. 119-28.
112. Haig, D. and C. Graham, *Genomic imprinting and the strange case of the insulin-like growth factor II receptor*. Cell, 1991. **64**(6): p. 1045-6.
113. Barlow, D.P. and M.S. Bartolomei, *Genomic imprinting in mammals*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(2).
114. Plasschaert, R.N. and M.S. Bartolomei, *Genomic imprinting in development, growth, behavior and stem cells*. Development, 2014. **141**(9): p. 1805-13.
115. Trivers, R. and A. Burt, *Kinship and genomic imprinting*. Results Probl Cell Differ, 1999. **25**: p. 1-21.
116. Kelsey, G., *Genomic imprinting--roles and regulation in development*. Endocr Dev, 2007. **12**: p. 99-112.
117. Gregg, C., et al., *High-resolution analysis of parent-of-origin allelic expression in the mouse brain*. Science, 2010. **329**(5992): p. 643-8.
118. Arnaud, P. and R. Feil, *Epigenetic deregulation of genomic imprinting in human disorders and following assisted reproduction*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2005. **75**(2): p. 81-97.
119. Smith, F.M., A.S. Garfield, and A. Ward, *Regulation of growth and metabolism by imprinted genes*. Cytogenet Genome Res, 2006. **113**(1-4): p. 279-91.
120. Cooper, W.N., et al., *Molecular subtypes and phenotypic expression of Beckwith-Wiedemann syndrome*. Eur J Hum Genet, 2005. **13**(9): p. 1025-32.
121. Jelinic, P. and P. Shaw, *Loss of imprinting and cancer*. J Pathol, 2007. **211**(3): p. 261-8.
122. Ulaner, G.A., et al., *Loss of imprinting of IGF2 and H19 in osteosarcoma is accompanied by reciprocal methylation changes of a CTCF-binding site*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(5): p. 535-49.
123. Jirtle, R.L., *IGF2 loss of imprinting: a potential heritable risk factor for colorectal cancer*. Gastroenterology, 2004. **126**(4): p. 1190-3.
124. Jirtle, R.L., *Genomic imprinting and cancer*. Exp Cell Res, 1999. **248**(1): p. 18-24.
125. Uribe-Lewis, S., et al., *Molecular mechanisms of genomic imprinting and clinical implications for cancer*. Expert Rev Mol Med, 2011. **13**: p. e2.
126. Feinberg, A.P., H. Cui, and R. Ohlsson, *DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms*. Semin Cancer Biol, 2002. **12**(5): p. 389-98.

127. Amor, D.J. and J. Halliday, *A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies*. Hum Reprod, 2008. **23**(12): p. 2826-34.
128. Khosla, S., et al., *Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype*. Hum Reprod Update, 2001. **7**(4): p. 419-27.
129. Zechner, U., et al., *Quantitative methylation analysis of developmentally important genes in human pregnancy losses after ART and spontaneous conception*. Mol Hum Reprod, 2010. **16**(9): p. 704-13.
130. Ludwig, M., et al., *Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples*. J Med Genet, 2005. **42**(4): p. 289-91.
131. Lidegaard, O., A. Pinborg, and A.N. Andersen, *Imprinting disorders after assisted reproductive technologies*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2006. **18**(3): p. 293-6.
132. Surani, M.A. and S.C. Barton, *Development of gynogenetic eggs in the mouse: implications for parthenogenetic embryos*. Science, 1983. **222**(4627): p. 1034-6.
133. Surani, M.A., S.C. Barton, and M.L. Norris, *Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis*. Nature, 1984. **308**(5959): p. 548-50.
134. McGrath, J. and D. Solter, *Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes*. Cell, 1984. **37**(1): p. 179-83.
135. Barton, S.C., M.A. Surani, and M.L. Norris, *Role of paternal and maternal genomes in mouse development*. Nature, 1984. **311**(5984): p. 374-6.
136. Feil, R., *Epigenetic asymmetry in the zygote and mammalian development*. Int J Dev Biol, 2009. **53**(2-3): p. 191-201.
137. Cortessis, V.K., et al., *Environmental epigenetics: prospects for studying epigenetic mediation of exposure-response relationships*. Hum Genet, 2012. **131**(10): p. 1565-89.
138. Buiting, K., *Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2010. **154C**(3): p. 365-76.
139. Horsthemke, B. and K. Buiting, *Imprinting defects on human chromosome 15*. Cytogenet Genome Res, 2006. **113**(1-4): p. 292-9.
140. Nicholls, R.D., et al., *Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion Prader-Willi syndrome*. Nature, 1989. **342**(6247): p. 281-5.
141. Eggermann, T., K. Eggermann, and N. Schonherr, *Growth retardation versus overgrowth: Silver-Russell syndrome is genetically opposite to Beckwith-Wiedemann syndrome*. Trends Genet, 2008. **24**(4): p. 195-204.
142. Bullman, H., et al., *Mosaic maternal uniparental disomy of chromosome 11 in a patient with Silver-Russell syndrome*. J Med Genet, 2008. **45**(6): p. 396-9.
143. Eggermann, T., et al., *Erratum to: Imprinting disorders: a group of congenital disorders with overlapping patterns of molecular changes affecting imprinted loci*. Clin Epigenetics, 2016. **8**: p. 27.
144. Mackay, D.J., et al., *Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57*. Nat Genet, 2008. **40**(8): p. 949-51.
145. Engel, E., *A fascination with chromosome rescue in uniparental disomy: Mendelian recessive outlaws and imprinting copyrights infringements*. Eur J Hum Genet, 2006. **14**(11): p. 1158-69.
146. Buiting, K., C. Williams, and B. Horsthemke, *Angelman syndrome - insights into a rare neurogenetic disorder*. Nat Rev Neurol, 2016. **12**(10): p. 584-93.
147. Margolis, S.S., et al., *Angelman Syndrome*. Neurotherapeutics, 2015. **12**(3): p. 641-50.

148. Williams, C.A. and J.L. Frias, *The Angelman ("happy puppet") syndrome*. Am J Med Genet, 1982. **11**(4): p. 453-60.
149. Driscoll, D.J., et al., *Prader-Willi Syndrome*, in *GeneReviews(R)*, R.A. Pagon, et al., Editors. 1993: Seattle (WA).
150. Shuman, C., J.B. Beckwith, and R. Weksberg, *Beckwith-Wiedemann Syndrome*, in *GeneReviews(R)*, R.A. Pagon, et al., Editors. 1993: Seattle (WA).
151. Wakeling, E.L., et al., *Diagnosis and management of Silver-Russell syndrome: first international consensus statement*. Nat Rev Endocrinol, 2017. **13**(2): p. 105-124.
152. Saal, H.M., *Russell-Silver Syndrome*, in *GeneReviews(R)*, R.A. Pagon, et al., Editors. 1993: Seattle (WA).
153. Netchine, I., et al., *11p15 imprinting center region 1 loss of methylation is a common and specific cause of typical Russell-Silver syndrome: clinical scoring system and epigenetic-phenotypic correlations*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(8): p. 3148-54.
154. Bruce, S., et al., *Clinically distinct epigenetic subgroups in Silver-Russell syndrome: the degree of H19 hypomethylation associates with phenotype severity and genital and skeletal anomalies*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(2): p. 579-87.
155. Temple, I.K., D.J.G. Mackay, and L.E. Docherty, *Diabetes Mellitus, 6q24-Related Transient Neonatal*, in *GeneReviews(R)*, R.A. Pagon, et al., Editors. 1993: Seattle (WA).
156. Kamiya, M., et al., *The cell cycle control gene ZAC/PLAGL1 is imprinted--a strong candidate gene for transient neonatal diabetes*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(3): p. 453-60.
157. Poradosu, S., et al., *Pseudohypoparathyroidism type 1B caused by methylation changes at the GNAS complex locus*. BMJ Case Rep, 2016. **2016**.
158. Molinaro, A., et al., *TSH elevations as the first laboratory evidence for pseudohypoparathyroidism type 1b (PHP-1b)*. J Bone Miner Res, 2015. **30**(5): p. 906-12.
159. Bastepe, M., et al., *Autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type 1b is associated with a heterozygous microdeletion that likely disrupts a putative imprinting control element of GNAS*. J Clin Invest, 2003. **112**(8): p. 1255-63.
160. da Rocha, S.T., et al., *Genomic imprinting at the mammalian Dlk1-Dio3 domain*. Trends Genet, 2008. **24**(6): p. 306-16.
161. Kagami, M., et al., *Deletions and epimutations affecting the human 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes*. Nat Genet, 2008. **40**(2): p. 237-42.
162. Alegria-Torres, J.A., A. Baccarelli, and V. Bollati, *Epigenetics and lifestyle*. Epigenomics, 2011. **3**(3): p. 267-77.
163. Feinberg, A.P., *Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 433-40.
164. Wadhwa, P.D., et al., *Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms*. Semin Reprod Med, 2009. **27**(5): p. 358-68.
165. El Hajj, N., et al., *Epigenetics and life-long consequences of an adverse nutritional and diabetic intrauterine environment*. Reproduction, 2014. **148**(6): p. R111-20.
166. Roseboom, T., S. de Rooij, and R. Painter, *The Dutch famine and its long-term consequences for adult health*. Early Hum Dev, 2006. **82**(8): p. 485-91.
167. Cooper, C., *David Barker (1938-2013)*. Nature, 2013. **502**(7471): p. 304.

168. Barker, D.J., *Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life*. Nutrition, 1997. **13**(9): p. 807-13.
169. Barker, D.J., *The origins of the developmental origins theory*. J Intern Med, 2007. **261**(5): p. 412-7.
170. Gluckman, P.D., et al., *Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases*. Nat Rev Endocrinol, 2009. **5**(7): p. 401-8.
171. Gluckman, P.D., et al., *Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease*. N Engl J Med, 2008. **359**(1): p. 61-73.
172. Whitelaw, N.C. and E. Whitelaw, *Transgenerational epigenetic inheritance in health and disease*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(3): p. 273-9.
173. Feil, R. and M.F. Fraga, *Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(2): p. 97-109.
174. Ashwal, E. and M. Hod, *Gestational diabetes mellitus: Where are we now?* Clin Chim Acta, 2015. **451**(Pt A): p. 14-20.
175. Coustan, D.R., *Gestational diabetes mellitus*. Clin Chem, 2013. **59**(9): p. 1310-21.
176. Torloni, M.R., et al., *Prepregnancy BMI and the risk of gestational diabetes: a systematic review of the literature with meta-analysis*. Obes Rev, 2009. **10**(2): p. 194-203.
177. Silva-Zolezzi, I., T.M. Samuel, and J. Spieldenner, *Maternal nutrition: opportunities in the prevention of gestational diabetes*. Nutr Rev, 2017. **75**(suppl 1): p. 32-50.
178. Ben-Haroush, A., Y. Yogev, and M. Hod, *Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes*. Diabet Med, 2004. **21**(2): p. 103-13.
179. American Diabetes, A., *Gestational diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2003. **26 Suppl 1**: p. S103-5.
180. Kelly, T., et al., *Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030*. Int J Obes (Lond), 2008. **32**(9): p. 1431-7.
181. Lehnen, H., U. Zechner, and T. Haaf, *Epigenetics of gestational diabetes mellitus and offspring health: the time for action is in early stages of life*. Mol Hum Reprod, 2013. **19**(7): p. 415-22.
182. Alptekin, H., et al., *Predicting gestational diabetes mellitus during the first trimester using anthropometric measurements and HOMA-IR*. J Endocrinol Invest, 2016. **39**(5): p. 577-83.
183. Dabelea, D., et al., *Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships*. Diabetes, 2000. **49**(12): p. 2208-11.
184. O'Sullivan, J.B., et al., *The potential diabetic and her treatment in pregnancy*. Obstet Gynecol 1966;27:683-9. Obstet Gynecol, 2003. **102**(1): p. 7.
185. Zhang, C., et al., *Genetic variants and the risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review*. Hum Reprod Update, 2013. **19**(4): p. 376-90.
186. Pettitt, D.J., et al., *Abnormal glucose tolerance during pregnancy in Pima Indian women. Long-term effects on offspring*. Diabetes, 1991. **40 Suppl 2**: p. 126-30.
187. Moore, T.R., *Fetal exposure to gestational diabetes contributes to subsequent adult metabolic syndrome*. Am J Obstet Gynecol, 2010. **202**(6): p. 643-9.
188. Franks, P.W., et al., *Gestational glucose tolerance and risk of type 2 diabetes in young Pima Indian offspring*. Diabetes, 2006. **55**(2): p. 460-5.
189. West, N.A., et al., *Cardiovascular risk factors in children exposed to maternal diabetes in utero*. Diabetologia, 2011. **54**(3): p. 504-7.

190. Nahum Sacks, K., et al., *Prenatal exposure to gestational diabetes mellitus as an independent risk factor for long-term neuropsychiatric morbidity of the offspring*. Am J Obstet Gynecol, 2016. **215**(3): p. 380 e1-7.
191. Wu, C.S., et al., *Long-term health outcomes in children born to mothers with diabetes: a population-based cohort study*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36727.
192. Silverman, B.L., et al., *Impaired glucose tolerance in adolescent offspring of diabetic mothers. Relationship to fetal hyperinsulinism*. Diabetes Care, 1995. **18**(5): p. 611-7.
193. Dabelea, D. and T. Crume, *Maternal environment and the transgenerational cycle of obesity and diabetes*. Diabetes, 2011. **60**(7): p. 1849-55.
194. Damm, P., *Future risk of diabetes in mother and child after gestational diabetes mellitus*. Int J Gynaecol Obstet, 2009. **104 Suppl 1**: p. S25-6.
195. El Hajj, N., et al., *Metabolic programming of MEST DNA methylation by intrauterine exposure to gestational diabetes mellitus*. Diabetes, 2013. **62**(4): p. 1320-8.
196. Kagami, M., et al., *Comprehensive clinical studies in 34 patients with molecularly defined UPD(14)pat and related conditions (Kagami-Ogata syndrome)*. Eur J Hum Genet, 2015. **23**(11): p. 1488-98.
197. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 611-22.
198. Untergasser, A., et al., *Primer3--new capabilities and interfaces*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(15): p. e115.
199. Pedersen, I.S., et al., *Frequent loss of imprinting of PEG1/MEST in invasive breast cancer*. Cancer Res, 1999. **59**(21): p. 5449-51.
200. Frommer, M., et al., *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(5): p. 1827-31.
201. Hayatsu, H., *Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis--a personal account*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2008. **84**(8): p. 321-30.
202. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
203. Spiegelman, S., K.F. Watson, and D.L. Kacian, *Synthesis of DNA complements of natural RNAs: a general approach*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(11): p. 2843-5.
204. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2001: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
205. Hurtado del Pozo, C., et al., *IPO8 and FBXL10: new reference genes for gene expression studies in human adipose tissue*. Obesity (Silver Spring), 2010. **18**(5): p. 897-903.
206. Bernstein, D.L., et al., *The BisPCR(2) method for targeted bisulfite sequencing*. Epigenetics Chromatin, 2015. **8**: p. 27.
207. Bibikova, M., et al., *High density DNA methylation array with single CpG site resolution*. Genomics, 2011. **98**(4): p. 288-95.
208. Dedeurwaerder, S., et al., *Evaluation of the Infinium Methylation 450K technology*. Epigenomics, 2011. **3**(6): p. 771-84.
209. Assenov, Y., et al., *Comprehensive analysis of DNA methylation data with RnBeads*. Nat Methods, 2014. **11**(11): p. 1138-40.
210. Horvath, S., *DNA methylation age of human tissues and cell types*. Genome Biol, 2013. **14**(10): p. R115.

211. Pidsley, R., et al., *A data-driven approach to preprocessing Illumina 450K methylation array data*. BMC Genomics, 2013. **14**: p. 293.
212. Aryee, M.J., et al., *Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays*. Bioinformatics, 2014. **30**(10): p. 1363-9.
213. Teschendorff, A.E., et al., *A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data*. Bioinformatics, 2013. **29**(2): p. 189-96.
214. Royo, J.L. and J.J. Galan, *Pyrosequencing for SNP genotyping*. Methods Mol Biol, 2009. **578**: p. 123-33.
215. Tost, J. and I.G. Gut, *Analysis of gene-specific DNA methylation patterns by pyrosequencing technology*. Methods Mol Biol, 2007. **373**: p. 89-102.
216. Ronaghi, M., M. Uhlen, and P. Nyren, *A sequencing method based on real-time pyrophosphate*. Science, 1998. **281**(5375): p. 363, 365.
217. Mardis, E.R., *Next-generation DNA sequencing methods*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008. **9**: p. 387-402.
218. Daigle, D., B.B. Simen, and P. Pochart, *High-throughput sequencing of PCR products tagged with universal primers using 454 life sciences systems*. Curr Protoc Mol Biol, 2011. **Chapter 7**: p. Unit7 5.
219. Rahmann S, B.J., Kanber D, Martin M, Horsthemke B, Buiting K, *Amplifyzer: Automated methylation analysis of amplicons from bisulfite flowgram sequencing*. PeerJ PrePrints, 2013. **1**: p. e122v2.
220. Derbyshire, V., et al., *Genetic and crystallographic studies of the 3',5'-exonucleolytic site of DNA polymerase I*. Science, 1988. **240**(4849): p. 199-201.
221. Klenow, H. and I. Henningsen, *Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from Escherichia coli B by limited proteolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1970. **65**(1): p. 168-75.
222. Martin, M., *Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads*. EMBnet.journal, 2011. **17**(1): p. 10-12.
223. Krueger, F. and S.R. Andrews, *Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications*. Bioinformatics, 2011. **27**(11): p. 1571-2.
224. Langmead, B. and S.L. Salzberg, *Fast gapped-read alignment with Bowtie 2*. Nat Methods, 2012. **9**(4): p. 357-9.
225. Thorvaldsdottir, H., J.T. Robinson, and J.P. Mesirov, *Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration*. Brief Bioinform, 2013. **14**(2): p. 178-92.
226. Robinson, J.T., et al., *Integrative genomics viewer*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(1): p. 24-6.
227. Ritchie, M.E., et al., *limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(7): p. e47.
228. Schneider, E., et al., *CpG sites with continuously increasing or decreasing methylation from early to late human fetal brain development*. Gene, 2016. **592**(1): p. 110-8.
229. Sandoval, J., et al., *Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome*. Epigenetics, 2011. **6**(6): p. 692-702.
230. Jaffe, A.E. and R.A. Irizarry, *Accounting for cellular heterogeneity is critical in epigenome-wide association studies*. Genome Biol, 2014. **15**(2): p. R31.

231. Ni, R., et al., *Mitochondrial Calpain-1 Disrupts ATP Synthase and Induces Superoxide Generation in Type 1 Diabetic Hearts: A Novel Mechanism Contributing to Diabetic Cardiomyopathy*. *Diabetes*, 2016. **65**(1): p. 255-68.
232. Wheeler, E., et al., *Genome-wide SNP and CNV analysis identifies common and low-frequency variants associated with severe early-onset obesity*. *Nat Genet*, 2013. **45**(5): p. 513-7.
233. Chen, Y.C., et al., *Protein kinase Ceta polymorphism and the susceptibility to ischemic stroke in the Taiwan population*. *Biomed J*, 2015. **38**(5): p. 433-8.
234. Sun, L., et al., *A quantitative assessment of the association between 1425G/A polymorphism in PRKCH and risk of stroke*. *Neuromolecular Med*, 2014. **16**(4): p. 814-20.
235. Schwenk, R.W., H. Vogel, and A. Schurmann, *Genetic and epigenetic control of metabolic health*. *Mol Metab*, 2013. **2**(4): p. 337-47.
236. Wulf-Johansson, H., et al., *Localization of microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4) in human tissues: clinical evaluation of serum MFAP4 and its association with various cardiovascular conditions*. *PLoS One*, 2013. **8**(12): p. e82243.
237. Bis, J.C., et al., *Meta-analysis of genome-wide association studies from the CHARGE consortium identifies common variants associated with carotid intima media thickness and plaque*. *Nat Genet*, 2011. **43**(10): p. 940-7.
238. Greer, S.N., et al., *The updated biology of hypoxia-inducible factor*. *EMBO J*, 2012. **31**(11): p. 2448-60.
239. Hatanaka, M., et al., *Hypoxia-inducible factor-3alpha functions as an accelerator of 3T3-L1 adipose differentiation*. *Biol Pharm Bull*, 2009. **32**(7): p. 1166-72.
240. Dick, K.J., et al., *DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis*. *Lancet*, 2014. **383**(9933): p. 1990-8.
241. Main, A.M., et al., *DNA methylation and gene expression of HIF3A: cross-tissue validation and associations with BMI and insulin resistance*. *Clin Epigenetics*, 2016. **8**: p. 89.
242. Haertle, L., et al., *Hypermethylation of the non-imprinted maternal MEG3 and paternal MEST alleles is highly variable among normal individuals*. *PLoS One*, 2017. **12**(8): p. e0184030.
243. Wojdacz, T.K., L.L. Hansen, and A. Dobrovic, *A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies*. *BMC Res Notes*, 2008. **1**: p. 54.
244. Warnecke, P.M., et al., *Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA*. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(21): p. 4422-6.
245. Shen, L., et al., *Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis*. *Biotechniques*, 2007. **42**(1): p. 48, 50, 52 passim.
246. Stevens, A.J., et al., *G-quadruplex structures and CpG methylation cause drop-out of the maternal allele in polymerase chain reaction amplification of the imprinted MEST gene promoter*. *PLoS One*, 2014. **9**(12): p. e113955.
247. Geuns, E., et al., *Methylation analysis of the intergenic differentially methylated region of DLK1-GTL2 in human*. *Eur J Hum Genet*, 2007. **15**(3): p. 352-61.
248. Kuhtz, J., et al., *Human in vitro oocyte maturation is not associated with increased imprinting error rates at LIT1, SNRPN, PEG3 and GTL2*. *Hum Reprod*, 2014. **29**(9): p. 1995-2005.
249. Chiefari, E., et al., *Gestational diabetes mellitus: an updated overview*. *J Endocrinol Invest*, 2017.

250. Zhu, Y. and C. Zhang, *Prevalence of Gestational Diabetes and Risk of Progression to Type 2 Diabetes: a Global Perspective*. *Curr Diab Rep*, 2016. **16**(1): p. 7.
251. Zhang, C. and Y. Ning, *Effect of dietary and lifestyle factors on the risk of gestational diabetes: review of epidemiologic evidence*. *Am J Clin Nutr*, 2011. **94**(6 Suppl): p. 1975S-1979S.
252. Group, H.S.C.R., et al., *Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(19): p. 1991-2002.
253. Di Cianni, G., et al., *Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2003. **19**(4): p. 259-70.
254. Agha, G., et al., *Adiposity is associated with DNA methylation profile in adipose tissue*. *Int J Epidemiol*, 2015. **44**(4): p. 1277-87.
255. Xu, G., et al., *Maternal diabetes and the risk of autism spectrum disorders in the offspring: a systematic review and meta-analysis*. *J Autism Dev Disord*, 2014. **44**(4): p. 766-75.
256. Clausen, T.D., et al., *Overweight and the metabolic syndrome in adult offspring of women with diet-treated gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(7): p. 2464-70.
257. Nguyen, Q.M., et al., *Utility of childhood glucose homeostasis variables in predicting adult diabetes and related cardiometabolic risk factors: the Bogalusa Heart Study*. *Diabetes Care*, 2010. **33**(3): p. 670-5.
258. Hanna, F.W., et al., *Diagnosing gestational diabetes mellitus: implications of recent changes in diagnostic criteria and role of glycated haemoglobin (HbA1c)*. *Clin Med (Lond)*, 2017. **17**(2): p. 108-113.
259. Ruchat, S.M., et al., *Gestational diabetes mellitus epigenetically affects genes predominantly involved in metabolic diseases*. *Epigenetics*, 2013. **8**(9): p. 935-43.
260. Ge, Z.J., et al., *Maternal obesity and diabetes may cause DNA methylation alteration in the spermatozoa of offspring in mice*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2014. **12**: p. 29.
261. Stegemann, R. and D.A. Buchner, *Transgenerational inheritance of metabolic disease*. *Semin Cell Dev Biol*, 2015. **43**: p. 131-40.
262. Holbrook, J.D., *Catching diabetes*. *Epigenomics*, 2016. **8**(9): p. 1173-7.
263. Quilter, C.R., et al., *Impact on offspring methylation patterns of maternal gestational diabetes mellitus and intrauterine growth restraint suggest common genes and pathways linked to subsequent type 2 diabetes risk*. *FASEB J*, 2014. **28**(11): p. 4868-79.
264. Reichetzedder, C., et al., *Increased global placental DNA methylation levels are associated with gestational diabetes*. *Clin Epigenetics*, 2016. **8**: p. 82.
265. Bouchard, L., et al., *Leptin gene epigenetic adaptation to impaired glucose metabolism during pregnancy*. *Diabetes Care*, 2010. **33**(11): p. 2436-41.
266. Bouchard, L., et al., *Placental adiponectin gene DNA methylation levels are associated with mothers' blood glucose concentration*. *Diabetes*, 2012. **61**(5): p. 1272-80.
267. Houde, A.A., et al., *Adaptations of placental and cord blood ABCA1 DNA methylation profile to maternal metabolic status*. *Epigenetics*, 2013. **8**(12): p. 1289-302.
268. Novakovic, B., et al., *Glucose as a fetal nutrient: dynamic regulation of several glucose transporter genes by DNA methylation in the human placenta across gestation*. *J Nutr Biochem*, 2013. **24**(1): p. 282-8.
269. Rong, C., et al., *DNA methylation profiles in placenta and its association with gestational diabetes mellitus*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2015. **123**(5): p. 282-8.

270. Finer, S., et al., *Maternal gestational diabetes is associated with genome-wide DNA methylation variation in placenta and cord blood of exposed offspring*. Hum Mol Genet, 2015. **24**(11): p. 3021-9.
271. del Rosario, M.C., et al., *Potential epigenetic dysregulation of genes associated with MODY and type 2 diabetes in humans exposed to a diabetic intrauterine environment: an analysis of genome-wide DNA methylation*. Metabolism, 2014. **63**(5): p. 654-60.
272. Hocher, B., et al., *Offspring sex determines the impact of the maternal ACE I/D polymorphism on maternal glycaemic control during the last weeks of pregnancy*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2011. **12**(3): p. 254-61.
273. Binder, A.M., et al., *Epigenome-wide and transcriptome-wide analyses reveal gestational diabetes is associated with alterations in the human leukocyte antigen complex*. Clin Epigenetics, 2015. **7**: p. 79.
274. Pfeiffer, S., et al., *Hypoxia-inducible factor 3A gene expression and methylation in adipose tissue is related to adipose tissue dysfunction*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 27969.
275. Holbrook, J.D., *Does diet interact with genotype to cause epigenetic modification of angiogenesis genes, on the trajectory to obesity?* Epigenomics, 2016. **8**(6): p. 741-5.
276. Ronn, T., et al., *Impact of age, BMI and HbA1c levels on the genome-wide DNA methylation and mRNA expression patterns in human adipose tissue and identification of epigenetic biomarkers in blood*. Hum Mol Genet, 2015. **24**(13): p. 3792-813.
277. Pan, H., et al., *HIF3A association with adiposity: the story begins before birth*. Epigenomics, 2015. **7**(6): p. 937-50.
278. Demerath, E.W., et al., *Epigenome-wide association study (EWAS) of BMI, BMI change and waist circumference in African American adults identifies multiple replicated loci*. Hum Mol Genet, 2015. **24**(15): p. 4464-79.
279. Wang, S., et al., *HIF3A DNA Methylation Is Associated with Childhood Obesity and ALT*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0145944.
280. Richmond, R.C., et al., *DNA Methylation and BMI: Investigating Identified Methylation Sites at HIF3A in a Causal Framework*. Diabetes, 2016. **65**(5): p. 1231-44.
281. Heikkila, M., et al., *Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha variants in the hypoxia response*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(23): p. 3885-901.
282. Pasanen, A., et al., *Hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha is subject to extensive alternative splicing in human tissues and cancer cells and is regulated by HIF-1 but not HIF-2*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(7): p. 1189-200.
283. Makino, Y., et al., *Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus*. J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 32405-8.
284. Maynard, M.A., et al., *Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma*. FASEB J, 2005. **19**(11): p. 1396-406.
285. Heidbreder, M., et al., *Non-hypoxic induction of HIF-3alpha by 2-deoxy-D-glucose and insulin*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **352**(2): p. 437-43.
286. Jonckheere, A.I., et al., *A complex V ATP5A1 defect causes fatal neonatal mitochondrial encephalopathy*. Brain, 2013. **136**(Pt 5): p. 1544-54.
287. Hejzlarova, K., et al., *Nuclear genetic defects of mitochondrial ATP synthase*. Physiol Res, 2014. **63 Suppl 1**: p. S57-71.
288. Zhao, Z., et al., *The gene for a human microfibril-associated glycoprotein is commonly deleted in Smith-Magenis syndrome patients*. Hum Mol Genet, 1995. **4**(4): p. 589-97.

289. Milicevic, N.M., et al., *The role of microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4) in the formation and function of splenic compartments during embryonic and adult life*. Cell Tissue Res, 2016. **365**(1): p. 135-45.
290. Blindbaek, S.L., et al., *Association between microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4) and micro- and macrovascular complications in long-term type 1 diabetes mellitus*. Acta Diabetol, 2017. **54**(4): p. 367-372.
291. Pal, D., S.P. Outram, and A. Basu, *Novel regulation of protein kinase C- ϵ* . Biochem Biophys Res Commun, 2012. **425**(4): p. 836-41.
292. Greif, H., et al., *The protein kinase C-related PKC-L(ϵ) gene product is localized in the cell nucleus*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(3): p. 1304-11.
293. Zurgil, U., et al., *PKC ϵ promotes senescence induced by oxidative stress and chemotherapy*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1531.
294. Shibui, A., et al., *Isolation and chromosomal mapping of a novel human gene showing homology to Na⁺/PO₄ cotransporter*. J Hum Genet, 1999. **44**(3): p. 190-2.
295. Togawa, N., et al., *A Na⁺-phosphate cotransporter homologue (SLC17A4 protein) is an intestinal organic anion exporter*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(11): p. C1652-60.
296. Lee, C. and C.H. Huang, *LASAGNA-Search: an integrated web tool for transcription factor binding site search and visualization*. Biotechniques, 2013. **54**(3): p. 141-53.
297. Stricker, R. and G. Reiser, *Functions of the neuron-specific protein ADAP1 (centaurin- α 1) in neuronal differentiation and neurodegenerative diseases, with an overview of structural and biochemical properties of ADAP1*. Biol Chem, 2014. **395**(11): p. 1321-40.
298. Bock, C., et al., *Quantitative comparison of genome-wide DNA methylation mapping technologies*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(10): p. 1106-14.
299. Beygo, J., et al., *Deep bisulfite sequencing of aberrantly methylated loci in a patient with multiple methylation defects*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76953.
300. Laurentino, S., et al., *Epigenetic germline mosaicism in infertile men*. Hum Mol Genet, 2015. **24**(5): p. 1295-304.
301. Beygo, J., et al., *The molecular function and clinical phenotype of partial deletions of the IGF2/H19 imprinting control region depends on the spatial arrangement of the remaining CTCF-binding sites*. Hum Mol Genet, 2013. **22**(3): p. 544-57.
302. Masser, D.R., D.R. Stanford, and W.M. Freeman, *Targeted DNA methylation analysis by next-generation sequencing*. J Vis Exp, 2015(96).
303. Masser, D.R., A.S. Berg, and W.M. Freeman, *Focused, high accuracy 5-methylcytosine quantitation with base resolution by benchtop next-generation sequencing*. Epigenetics Chromatin, 2013. **6**(1): p. 33.
304. Xi, Y. and W. Li, *BSMAP: whole genome bisulfite sequence MAPping program*. BMC Bioinformatics, 2009. **10**: p. 232.
305. Rancourt, R.C., et al., *The prevalence of loss of imprinting of H19 and IGF2 at birth*. FASEB J, 2013. **27**(8): p. 3335-43.
306. Sakatani, T., et al., *Epigenetic heterogeneity at imprinted loci in normal populations*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **283**(5): p. 1124-30.
307. Lui, J.C., et al., *An imprinted gene network that controls mammalian somatic growth is down-regulated during postnatal growth deceleration in multiple organs*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. **295**(1): p. R189-96.
308. Cui, H., et al., *Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk*. Science, 2003. **299**(5613): p. 1753-5.

309. Cui, H., et al., *Loss of imprinting in normal tissue of colorectal cancer patients with microsatellite instability*. Nat Med, 1998. **4**(11): p. 1276-80.
310. Tycko, B., *Epigenetic gene silencing in cancer*. J Clin Invest, 2000. **105**(4): p. 401-7.
311. Sapienza, C., *Genome imprinting, cellular mosaicism and carcinogenesis*. Mol Carcinog, 1990. **3**(3): p. 118-21.
312. Nakanishi, H., et al., *Loss of imprinting of PEG1/MEST in lung cancer cell lines*. Oncol Rep, 2004. **12**(6): p. 1273-8.
313. Weber, M., et al., *Extensive tissue-specific variation of allelic methylation in the Igf2 gene during mouse fetal development: relation to expression and imprinting*. Mech Dev, 2001. **101**(1-2): p. 133-41.
314. Pliushch, G., et al., *Extreme methylation values of imprinted genes in human abortions and stillbirths*. Am J Pathol, 2010. **176**(3): p. 1084-90.
315. Kosaki, K., et al., *Isoform-specific imprinting of the human PEG1/MEST gene*. Am J Hum Genet, 2000. **66**(1): p. 309-12.
316. Riesewijk, A.M., et al., *Monoallelic expression of human PEG1/MEST is paralleled by parent-specific methylation in fetuses*. Genomics, 1997. **42**(2): p. 236-44.
317. Moon, Y.S., et al., *Imprinting and expression status of isoforms 1 and 2 of PEG1/MEST gene in uterine leiomyoma*. Gynecol Obstet Invest, 2010. **70**(2): p. 120-5.
318. Kohda, M., et al., *Frequent loss of imprinting of IGF2 and MEST in lung adenocarcinoma*. Mol Carcinog, 2001. **31**(4): p. 184-91.
319. Kim, J., C.L. Bretz, and S. Lee, *Epigenetic instability of imprinted genes in human cancers*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(22): p. 10689-99.
320. Nikonova, L., et al., *Mesoderm-specific transcript is associated with fat mass expansion in response to a positive energy balance*. FASEB J, 2008. **22**(11): p. 3925-37.
321. Kamei, Y., et al., *Peg1/Mest in obese adipose tissue is expressed from the paternal allele in an isoform-specific manner*. FEBS Lett, 2007. **581**(1): p. 91-6.
322. Kaneko-Ishino, T., et al., *Peg1/Mest imprinted gene on chromosome 6 identified by cDNA subtraction hybridization*. Nat Genet, 1995. **11**(1): p. 52-9.
323. Soubry, A., et al., *Newborns of obese parents have altered DNA methylation patterns at imprinted genes*. Int J Obes (Lond), 2015. **39**(4): p. 650-7.
324. Takahashi, M., Y. Kamei, and O. Ezaki, *Mest/Peg1 imprinted gene enlarges adipocytes and is a marker of adipocyte size*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(1): p. E117-24.
325. Koza, R.A., et al., *Changes in gene expression foreshadow diet-induced obesity in genetically identical mice*. PLoS Genet, 2006. **2**(5): p. e81.
326. Kozak, L.P., et al., *The early nutritional environment of mice determines the capacity for adipose tissue expansion by modulating genes of caveolae structure*. PLoS One, 2010. **5**(6): p. e11015.
327. Lefebvre, L., et al., *Abnormal maternal behaviour and growth retardation associated with loss of the imprinted gene Mest*. Nat Genet, 1998. **20**(2): p. 163-9.
328. Kim, J., et al., *Lineage-specific imprinting and evolution of the zinc-finger gene ZIM2*. Genomics, 2004. **84**(1): p. 47-58.
329. Kuroiwa, Y., et al., *Peg3 imprinted gene on proximal chromosome 7 encodes for a zinc finger protein*. Nat Genet, 1996. **12**(2): p. 186-90.
330. Kim, J., et al., *The human homolog of a mouse-imprinted gene, Peg3, maps to a zinc finger gene-rich region of human chromosome 19q13.4*. Genome Res, 1997. **7**(5): p. 532-40.

331. Relaix, F., et al., *Pw1/Peg3 is a potential cell death mediator and cooperates with Siah1a in p53-mediated apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(5): p. 2105-10.
332. Nye, M.D., et al., *Associations between methylation of paternally expressed gene 3 (PEG3), cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56325.
333. Feng, W., et al., *Imprinted tumor suppressor genes ARHI and PEG3 are the most frequently down-regulated in human ovarian cancers by loss of heterozygosity and promoter methylation*. Cancer, 2008. **112**(7): p. 1489-502.
334. Curley, J.P., et al., *Increased body fat in mice with a targeted mutation of the paternally expressed imprinted gene Peg3*. FASEB J, 2005. **19**(10): p. 1302-4.
335. Schmidt, J.V., et al., *The Dlk1 and Gtl2 genes are linked and reciprocally imprinted*. Genes Dev, 2000. **14**(16): p. 1997-2002.
336. Laborda, J., *The role of the epidermal growth factor-like protein dlk in cell differentiation*. Histol Histopathol, 2000. **15**(1): p. 119-29.
337. Kawakami, T., et al., *Imprinted DLK1 is a putative tumor suppressor gene and inactivated by epimutation at the region upstream of GTL2 in human renal cell carcinoma*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(6): p. 821-30.
338. Zhang, X., et al., *Maternally expressed gene 3 (MEG3) noncoding ribonucleic acid: isoform structure, expression, and functions*. Endocrinology, 2010. **151**(3): p. 939-47.
339. Kameswaran, V., et al., *Epigenetic regulation of the DLK1-MEG3 microRNA cluster in human type 2 diabetic islets*. Cell Metab, 2014. **19**(1): p. 135-45.
340. Zhang, X., et al., *A pituitary-derived MEG3 isoform functions as a growth suppressor in tumor cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(11): p. 5119-26.
341. Zhou, Y., et al., *Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA*. J Biol Chem, 2007. **282**(34): p. 24731-42.
342. Gejman, R., et al., *Selective loss of MEG3 expression and intergenic differentially methylated region hypermethylation in the MEG3/DLK1 locus in human clinically nonfunctioning pituitary adenomas*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(10): p. 4119-25.
343. Murphy, S.K., et al., *Epigenetic detection of human chromosome 14 uniparental disomy*. Hum Mutat, 2003. **22**(1): p. 92-7.
344. Plass, C. and P.D. Soloway, *DNA methylation, imprinting and cancer*. Eur J Hum Genet, 2002. **10**(1): p. 6-16.
345. Kagami, M., et al., *The IG-DMR and the MEG3-DMR at human chromosome 14q32.2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers*. PLoS Genet, 2010. **6**(6): p. e1000992.
346. Greife, A., et al., *Concomitant downregulation of the imprinted genes DLK1 and MEG3 at 14q32.2 by epigenetic mechanisms in urothelial carcinoma*. Clin Epigenetics, 2014. **6**(1): p. 29.
347. van Montfoort, A.P., et al., *Assisted reproduction treatment and epigenetic inheritance*. Hum Reprod Update, 2012. **18**(2): p. 171-97.
348. Engel, N., J.L. Thorvaldsen, and M.S. Bartolomei, *CTCF binding sites promote transcription initiation and prevent DNA methylation on the maternal allele at the imprinted H19/Igf2 locus*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(19): p. 2945-54.
349. Schoenherr, C.J., J.M. Levorse, and S.M. Tilghman, *CTCF maintains differential methylation at the Igf2/H19 locus*. Nat Genet, 2003. **33**(1): p. 66-9.

350. Kelsey, G. and R. Feil, *New insights into establishment and maintenance of DNA methylation imprints in mammals*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2013. **368**(1609): p. 20110336.
351. Rakyan, V.K., et al., *Metastable epialleles in mammals*. Trends Genet, 2002. **18**(7): p. 348-51.
352. Dominguez-Salas, P., et al., *Maternal nutrition at conception modulates DNA methylation of human metastable epialleles*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3746.
353. Morgan, H.D., et al., *Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse*. Nat Genet, 1999. **23**(3): p. 314-8.
354. Miltenberger, R.J., et al., *The role of the agouti gene in the yellow obese syndrome*. J Nutr, 1997. **127**(9): p. 1902S-1907S.
355. Harris, R.A., D. Nagy-Szakal, and R. Kellermayer, *Human metastable epiallele candidates link to common disorders*. Epigenetics, 2013. **8**(2): p. 157-63.

5.2 Online Quellen für Abbildungen

- Abbildung 4 zu Imprinting-Syndromen
European Network for Human Congenital Imprinting Disorders
<http://www.imprinting-disorders.eu/?p=2373>
- Abbildung 7 zum Ablauf der FlexiGene DNA Isolation
FlexiGene DNA Handbook
<https://www.qiagen.com/kr/resources/resourcedetail?id=6b147421-7846-411e-9993-bb01563b807e&lang=en>
- Abbildung 8 zur Basensequenzveränderung durch Bisulfitkonvertierung
<https://www.diaqnode.com/applications/dna-bisulfite-conversion>
- Abbildung 9 zur chemischen Reaktion der Bisulfitkonvertierung von Cytosin
EpiMark Bisulfite Conversion Kit
<http://www.neb-online.de/neb/epigenetik/epimark-kits/#!>
- Abbildung 10 zur TruSeq Index Plate Fixture für die finale PCR
New England Biolabs (NEB) Homepage
https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Protocols/C1A38CEF02DE4C6E8F70A6D00B1EC9A7/Content/PCR_plate.jpg
- Abbildung 11 zum Größenstandard DNA-Leiter
<http://onsnetwork.org/blog/tag/ogeneruler-dna-ladder-mix/>
- Abbildung 14 zum Qubit Workflow
iQuant HS dsDNA quantitation
<http://www.abpbio.com/wp-content/uploads/Nucleic-Acid-Solution-Quantitation-Kits/High-Sensitivity-dsDNA2.jpg>
- Abbildung 15 zum Pyrosequenzierungsprinzip
Qiagen Homepage
<https://www.qiagen.com/sg/resources/technologies/pyrosequencing-resource-center/technology-overview/#comparison>
- Abbildung 18 zur SPRI Aufreinigungs-Chemie für DNA
Beckman Coulter Homepage
<http://www.labplan.ie/3page.asp?Menu=191&Page=701&SubPage=20>
- Abbildung 19 zur klonalen Amplifizierung mittels emPCR
<http://www.nature.com/nmeth/journal/v5/n9/images/nmeth.f.220-F2.jpg>
- Abbildung 20 zum Beladen der PicoTiterPlate (PTP) mit DNA-tragenden Capture Beads
http://images.slideplayer.com/20/5978508/slides/slide_6.jpg
- Abbildung 23 zum NEB Dual Index Workflow for Illumina
New England Biolabs (NEB) Homepage
<https://www.neb.com/products/e7600-nebnext-multiplex-oligos-for-illumina-dual-index-primers-set-1>

6 Verzeichnisse

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
∞	Unendlichzeichen
\emptyset	Durchschnitt
Δ	Delta
♂	männlich
♀	weiblich
%	Prozent
°C	Grad Celsius
5mC	5-Methylcytosin
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
A	
A	Adenin (DNA-Base)
ACE	<i>engl.</i> angiotensin converting enzyme
ad	auffüllen auf
ADA	<i>engl.</i> American Dietetic Association
ADAP1	<i>engl.</i> ArfGAP with dual PH domains 1
ADP	Adenosindiphosphat
AGA	<i>engl.</i> appropriate for gestational age (10%-90% Perzentile)
AMELX	Amelogenin, X-linked
AMELY	Amelogenin, Y-linked
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	<i>engl.</i> Analysis of Variance (Varianzanalyse)
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARNT	<i>engl.</i> aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ART	<i>engl.</i> assisted reproductive technology
AS	Angelman Syndrom
ASD	<i>engl.</i> autism spectrum disorder
ATP	Adenosintriphosphat (Kurzform von dATP)
ATP5A1	<i>engl.</i> ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1
AUT	Primer A Universal Tag und 454 Titanium
A^{vy}	<i>engl.</i> agouti viable yellow
$Axin^{Fu}$	<i>engl.</i> axin fused
B	
BDD	<i>engl.</i> bead deposition device
BE	<i>engl.</i> base excess
BHD	Bluthochdruck
BMI	<i>engl.</i> body mass index
BMIQ	<i>engl.</i> Beta Mixture Quantile Dilation

bp	Basenpaar(e)
BP	<i>lat.</i> Bipara (Zweitgebärende)
BSAS	<i>engl.</i> Bisulfite Amplicon Sequencing
BUT	Primer B Universal Tag und 454 Titanium
BWS	Beckwith-Wiedemann Syndrom
bzw.	beziehungsweise
C	
C	Cytosin (DNA-Base)
ca.	<i>lat.</i> circa (etwa, ungefähr)
CCD	<i>engl.</i> charged coupled device
cDNA	<i>engl.</i> complementary DNA
CDKN1C	<i>engl.</i> cyclin dependent kinase inhibitor 1C
CGI	CpG-Insel
CH ₃	Methylgruppe
Chr.	Chromosom
CI	<i>engl.</i> confidence interval
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin Dinukleotid
CS	<i>engl.</i> cesarean section
Ct	<i>engl.</i> cycle threshold
D	
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dATP α S	Desoxyadenosin-alpha-thiotriphosphat
DBS	Deep Bisulfite Sequencing
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
D-GDM	diätisch behandelter GDM
dl	Deziliter
DLK1	<i>engl.</i> delta like non-canonical notch ligand 1
DMD	<i>engl.</i> differentially methylated domain
DMR	<i>engl.</i> differentially methylated region
DNA	<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid
DNMT	DNA-Methyltransferase
DNMT3L	<i>engl.</i> DNMT3-like
DNP	Dinitrophenyl
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOHAD	<i>engl.</i> developmental origins of health and disease
dsDNA	doppelsträngige DNA
E	

E16	<i>engl.</i> embryonic day 16
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	<i>engl.</i> estonia
EM	<i>engl.</i> embryonic lineage
emPCR	<i>engl.</i> emulsion PCR
engl.	englisch
et al.	<i>lat.</i> et alia (und andere/ weitere)
etc.	<i>lat.</i> et cetera (und die übrigen)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EWAS	<i>engl.</i> epigenome-wide association studies
EX	<i>engl.</i> extraembryonic lineage
F	
FCB	<i>engl.</i> fetal cord blood
FDR	<i>engl.</i> false discovery rate
G	
g	Gramm
G	geprägt
G	Guanin (DNA-Base)
GAPDH	<i>engl.</i> glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase
GDM	<i>engl.</i> gestational diabetes mellitus
gDMR	gametische DMR
gDNA	<i>engl.</i> genomic DNA
GER	<i>engl.</i> germany
GLUT	<i>engl.</i> glucose transporter
GNAS	<i>engl.</i> guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha
GORILLA	<i>engl.</i> Gene Ontology Erichment Analysis and Visualization Tool
GRB10	<i>engl.</i> growth factor receptor bound protein 10
GTL2	<i>engl.</i> glycosyltransferase-like protein 2
GWAS	<i>engl.</i> genome-wide association studies
H	
h	<i>engl.</i> hour(s)
H+	Wasserstoffion
H19	<i>engl.</i> imprinted maternally expressed transcript (non-protein coding)
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HIF3A	<i>engl.</i> hypoxia inducible factor 3 alpha subunit
HKG	<i>engl.</i> housekeeping gene
HMT	Histon-Methyltransferase
HNA	<i>engl.</i> hypermethylation of the non-imprinted allele
HPRT1	<i>engl.</i> hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H3K4me2	<i>engl.</i> histone 3 lysine 4 dimethylation
H3K4me3	<i>engl.</i> histone 3 lysine 4 trimethylation
H3K9me2	<i>engl.</i> histone 3 lysine 9 diimethylation

H ₂ O	Wasser
HPLC	<i>engl.</i> high-performance liquid chromatography
HYMAI	<i>engl.</i> hydatidiform mole associated and imprinted (non-protein coding)
I	
IAP	<i>engl.</i> intracisternal A-particle
ICR	<i>engl.</i> imprinting control region
ICSI	intrazytoplasmatische Spermieninjektion
ID	<i>engl.</i> identification
ID	<i>engl.</i> imprinting disorder
iDMR	<i>engl.</i> imprinting-specific DMR
I-GDM	Insulin behandelter GDM
IG-DMR	intergenische DMR
IGF2	<i>engl.</i> insulin-growth factor 2
IGF2R	<i>engl.</i> insulin-growth factor 2 receptor
IGT	<i>engl.</i> impaired glucose tolerance
IGV	<i>engl.</i> Integrative Genomics Viewer
IPO8	<i>engl.</i> importin 8
IQR	<i>engl.</i> interquartile range
IUPAC	<i>engl.</i> International Union of Pure and Applied Chemistry
IVF	In-vitro-Fertilisation
J	
K	
K	Kontrolle
K	Kilo (1000)
kb	Kilobasenpaar(e)
KCNQ1	<i>engl.</i> potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1
kg	Kilogramm
KOS14	Kagami-Otaga Syndrom
L	
L	Liter
lat.	lateinisch
LGA	<i>engl.</i> large for gestational age (> 90% Perzentile)
LOI	<i>engl.</i> loss of Imprinting
M	
M	Molare Masse
m ²	Quadratmeter
mm ²	Quadratmillimeter
MAF	<i>engl.</i> minor allele frequency
Max	Maximum
MBP	<i>engl.</i> methyl-CpG binding proteins
ME	metastabiles Epiallel
MeDIP-seq	<i>engl.</i> Methylated DNA Immunoprecipitation Sequencing
MEG	<i>engl.</i> maternally expressed gene
MEG3	<i>engl.</i> maternally expressed gene 3
MEG8	<i>engl.</i> maternally expressed gene 8

MEST	<i>engl.</i> mesoderm specific transcript
Meth.	Methylierung
MethylCap-seq	<i>engl.</i> Methylated DNA Capture by Affinity Purification Sequencing
MFAP4	<i>engl.</i> microfibrillar associated protein 4
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MID	<i>engl.</i> multiplex identifiers
min	Minute
Min	Minimum
MIQE	<i>engl.</i> Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments
miRNA	<i>engl.</i> micro-RNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MP	<i>lat.</i> Multipara (mehr als zwei erfolgreich durchlebte Schwangerschaften)
MPC	<i>engl.</i> magnetic particle collector
MT	Multiples Testen nach Benjamini-Hochberg
MWU	Mann-Whitney-U
N	
n	Probenzahl
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaHSO ₃	Natriumbisulfit
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	<i>engl.</i> National Center for Biotechnology Information
ncRNA	<i>engl.</i> non-coding RNA
n.d.	<i>engl.</i> not determined
ng	Nanogramm
NG	nicht geprägt
NGS	<i>engl.</i> Next Generation Sequencing
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NR	Nichtraucher
Nr.	Nummer
O	
oGTT	oraler Glukosetoleranztest
P	
p	kurzer Chromosomenarm
PCR	<i>engl.</i> polymerase chain reaction
PEG	<i>engl.</i> paternally expressed gene
PEG1	<i>engl.</i> paternally expressed gene 1
PEG3	<i>engl.</i> paternally expressed gene 3
PEG3	<i>engl.</i> paternally expressed gene 10
PGC	<i>engl.</i> primordial germ cell
pH	<i>lat.</i> potentia hydrogenii

PHP-1b	Pseudohypoparathyreoidismus 1b
PK	Präeklampsie
PKC	Protein Kinase C
PLAG1	<i>engl.</i> pleiomorphicadenoma of the salivary gland gene like 1
pM	picomolar
PP	<i>lat.</i> Primipara (Erstgebärende)
PPi	Pyrophosphat
PRKCH	<i>engl.</i> protein kinase C eta
PTH	<i>engl.</i> parathyroid hormone
PTP	<i>engl.</i> PicoTtiterPlate
p-Wert	<i>engl.</i> probability value
PWS	Prader-Willi Syndrom
Pyro	Pyrosequenzierung
Q	
q	langer Chromosomenarm
QUASEP	<i>engl.</i> Quantification of Allele-specific Expression by Pyrosequencing
R	
R	Raucher
RefSeq	Referenz-Sequenz
RG	<i>engl.</i> reference gene
RNA	<i>engl.</i> ribonucleic acid
RNAi	<i>engl.</i> RNA interference
ROI	<i>engl.</i> relaxation of imprinting
RPLP0	<i>engl.</i> ribosomal protein lateral stalk subunit P0
rpm	<i>engl.</i> revolutions per minute
RRBS	<i>engl.</i> Reduced Representation Bisulfite Sequencing
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RTL1	<i>engl.</i> retrotransposon gag like 1
RTL1as	<i>engl.</i> retrotransposon gag like 1 antisense
RT-qPCR	<i>engl.</i> reverse transcription quantitative real-time PCR
RQ	relative Quantifizierung
S	
s	Sekunde
SAM-CH ₃	S-Adenosylmethionin
SD	<i>engl.</i> standard deviation
sDMR	somatische DMR
SE	<i>engl.</i> standard error
SF	Schilddrüsenfehlfunktion
SFF	<i>engl.</i> standard flowgram files
SGA	<i>engl.</i> small for gestational age (<10% Perzentile)
SLC17A4	<i>engl.</i> solute carrier family 17 member 4
SMS	Smith-Magenis Syndrom
SMT	<i>engl.</i> single molecule tagging
snoRNA	<i>engl.</i> small nucleolar ribonucleic acid

SNP	<i>engl.</i> single nucleotide polymorphism
SNRPN	<i>engl.</i> small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N
SNURF	<i>engl.</i> SNRPN upstream reading frame
SPSS	<i>engl.</i> Statistical Package for the Social Science
SPRI	<i>engl.</i> solid phase reversible immobilisation
SRS	Silver-Russell Syndrom
SSW	Schwangerschaftswoche
SWE	<i>engl.</i> sweden
STX16	<i>engl.</i> syntaxin 16
T	
T	Thymin (DNA-Base)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TDM1/TDM2	Typ 1 Diabetes mellitus/ Typ 2 Diabetes mellitus
TE	<i>engl.</i> transposable element
TE	Tris-EDTA
Temp.	Temperatur
TET	<i>engl.</i> ten-eleven translocation
TFBS	<i>engl.</i> transcription factor binding site
TNDM1	transienter neonataler Diabetes mellitus Typ 1
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSH	<i>engl.</i> thyroid stimulating hormone
TS14	Temple Syndrom
TSS	<i>engl.</i> transcription start side
U	
U	Uracil
U	<i>engl.</i> unit(s) (Enzymeinheit)
UBE3A	<i>engl.</i> ubiquitin protein ligase E3A
UCSC	<i>engl.</i> University of Carlifornia, Santa Cruz
UPD	Uniparentale Disomie
USA	<i>engl.</i> United States of America
USER	<i>engl.</i> uracil-specific excision reagent
UTR	<i>engl.</i> untranslated region
UV	Ultraviolet
UVB	<i>engl.</i> unassisted vaginal birth
V	
V	Volt
VAT	<i>engl.</i> visceral adipose tissue
vs.	<i>lat.</i> versus
VVB	<i>engl.</i> ventouse-assisted vaginal birth
W	
Wdh.	Wiederholung
WGA	<i>engl.</i> whole genome amplification
WGBS	<i>engl.</i> whole genome bisulfite sequencing
WoP	<i>engl.</i> week of pregnancy
X	

	XIC	X-Chromosom Inaktivierung
Y		
Z		
	z. B.	zum Beispiel
	ZFP57	<i>engl.</i> zinc finger protein 57 homolog
	ZIM2	<i>engl.</i> zinc finger imprinted 2

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiel eines geprägten Genclusters	12
Abbildung 2: Methylierungsreprogrammierung in der Keimbahn und im Präimplantationsembryo (Maus)	14
Abbildung 3: Auswirkungen uniparentaler Disomien auf die Gendosis.....	18
Abbildung 4: Klinische Phänotypen und Gemeinsamkeiten aller Imprinting-Syndrome	20
Abbildung 5: Anstieg der GDM-induzierten IGT und Diabetes-Prävalenz.....	26
Abbildung 6: Clustal Omega Alignment der Pyrosequenzierungsprimer.....	42
Abbildung 7: Ablauf der FlexiGene DNA Isolation.....	50
Abbildung 8: Basensequenzveränderung durch Bisulfitkonvertierung.....	51
Abbildung 9: Chemische Reaktion der Bisulfitkonvertierung von Cytosin	52
Abbildung 10: TruSeq Index Plate Fixture für die finale PCR	58
Abbildung 11: Größenstandard DNA-Leiter	59
Abbildung 12: Infinium I Assay.....	64
Abbildung 13: Infinium II Assay.....	65
Abbildung 14: Qubit Workflow	66
Abbildung 15: Pyrosequenzierungsprinzip.....	69
Abbildung 16: DBS Workflow mit der Roche GS Junior Technologie	73
Abbildung 17: Prinzip zur Generierung einer DBS-Library mit der Roche GS Junior Technologie	74
Abbildung 18: SPRI Aufreinigungsschemie für DNA	75
Abbildung 19: Klonale Amplifizierung mittels emPCR	77
Abbildung 20: Beladen der PicoTiterPlate (PTP) mit DNA-tragenden Capture Beads	79
Abbildung 21: DBS Workflow mit der Illumina MiSeq Technologie	80
Abbildung 22: Prinzip zur Generierung einer DBS-Library mit der Illumina MiSeq Technologie	81
Abbildung 23: NEB Dual Index Workflow for Illumina	83
Abbildung 24: Ablauf der GDM-Array Studie mit Pyrosequenzierungsvalidierung	88
Abbildung 25: Globale DNA-Methylierung der Array-Datensätze	91
Abbildung 26: Abschätzung der Blutzellzusammensetzung.....	95
Abbildung 27: RnBeads pH-Gruppen-Vergleich im Array-Datensatz A	96
Abbildung 28: Methylierungsdifferenz der Pyrosequenzierung GDM vs. Kontrollen	100
Abbildung 29: <i>ADAP1</i> -Pyrosequenzierungsergebnisse im Gruppenvergleich	103
Abbildung 30: Roche GS Junior Methylierung ohne Allel-Unterscheidung.....	106
Abbildung 31: Roche GS Junior Methylierung der elterlichen Allele	108
Abbildung 32: Roche GS Junior CpG-Methylierung als Heatmap.....	109
Abbildung 33: Roche GS Junior Verteilung der prozentualen Read-Methylierung.....	111
Abbildung 34: Roche GS Junior Epimutationsrate der elterlichen Allele	112
Abbildung 35: Roche GS Junior interindividuelle Variation der parentalen ER	113
Abbildung 36: Roche GS Junior paternale Methylierung und Epimutationsrate	115
Abbildung 37: Verhältnis der Methylierung und der Genexpression in VAT Proben.....	117
Abbildung 38: Illumina MiSeq Methylierung ohne Allel Unterscheidung.....	119
Abbildung 39: Illumina MiSeq Methylierung der elterlichen Allele	120
Abbildung 40: Illumina MiSeq CpG-Methylierung als Heatmap	121
Abbildung 41: Illumina MiSeq Verteilung der prozentualen Read-Methylierung.....	124
Abbildung 42: Illumina MiSeq Epimutationsrate der elterlichen Allele	125
Abbildung 43: Illumina MiSeq interindividuelle Variation der parentalen ER	126
Abbildung 44: Illumina MiSeq ERs für <i>MEG3</i> IG-DMR und <i>MEG3</i> Promotor	127
Abbildung 45: Methylierung im GDM/Kontrollen Vergleich.....	128
Abbildung 46: Methylierung der elterlichen Allele im GDM/Kontrollen Vergleich	130
Abbildung 47: Epimutationsrate der elterlichen Allele im GDM/Kontrollen Vergleich	132
Abbildung 48: Schematische Darstellung der Prägung des <i>DLK1-MEG3</i> Locus	152

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Parameter der analysierten Arraykohorten	31
Tabelle 2: Klinische Parameter der analysierten Pyrosequenzierungskohorte	33
Tabelle 3: Adulte Blutkohorte	34
Tabelle 4: Kommerzielle Kits und Reagenzien mit Herstellerinformationen	35
Tabelle 5: Chemikalien mit Herstellerinformationen	35
Tabelle 6: Apparaturen mit Herstellerinformationen	36
Tabelle 7: Verwendete Programme und Online-Tools	37
Tabelle 8: Von Hand gemachte Puffer	38
Tabelle 9: Primer für Pyrosequenzierungen (Template: bisulfitkonvertierte DNA)	41
Tabelle 10: Primer für Genotypisierungen (Template: nicht bisulfitkonvertierte DNA)	43
Tabelle 11: Primer für NGS mit dem Roche GS Junior (Template: bisulfitkonvertierte DNA)	43
Tabelle 12: MID-Primer für library barcoding mit dem Roche GS Junior (Template: PCR-Produkt)	44
Tabelle 13: Primer für NGS mit dem Illumina MiSeq (Template: bisulfitkonvertierte DNA)	46
Tabelle 14: Index-Primer für library barcoding mit dem Illumina MiSeq (Template: PCR-Produkt)	47
Tabelle 15: Primer für RT-qPCR (Template: nicht bisulfitkonvertierte DNA)	48
Tabelle 16: PCR-Bedingungen für die Genotypisierung	54
Tabelle 17: PCR-Bedingungen für die Pyrosequenzierung	54
Tabelle 18: PCR-Bedingungen für DBS mit dem Roche GS Junior	54
Tabelle 19: PCR-Bedingungen für DBS mit dem Illumina MiSeq	55
Tabelle 20: PCR-Mastermix für einen Ansatz	56
Tabelle 21: PCR-Mastermix für DBS mit dem Roche GS Junior unterteilt in erste und zweite PCR	57
Tabelle 22: PCR-Mastermix für DBS mit dem Illumina MiSeq (zweite PCR)	57
Tabelle 23: RT-qPCR Mastermix und Cyclerprogramm	61
Tabelle 24: Vor- und Nachteile der verwendeten Bisulfitsequenzierungsmethoden	62
Tabelle 25: A Tailing Mastermix und Temperaturen der Enzyminkubation und Enzyminaktivierung	82
Tabelle 26: Adapter Ligation und USER-Enzym Behandlung: Enzyminkubation und Inaktivierung	83
Tabelle 27: Ligationseffizienz-PCR: Mastermix und Cyclerprogramm	84
Tabelle 28: Zweite PCR: Mastermix und Cyclerprogramm	84
Tabelle 29: Globale DNA-Methylierung unterteilt in CpG Subgruppen	91
Tabelle 30: Array-CpGs mit signifikanten Methylierungsdifferenzen zwischen GDM und Kontrollen	93
Tabelle 31: β -Werte und p-Werte der Gruppen- und Subgruppenvergleiche	99
Tabelle 32: Multivariate Regressionsanalyse der Pyrosequenzierungsdaten	101
Tabelle 33: Roche GS Junior Run-Parameter	105
Tabelle 34: Roche GS Junior Methylierung ohne Allel-Unterscheidung	106
Tabelle 35: Roche GS Junior Methylierung der beiden elterlichen Allele	107
Tabelle 36: Roche GS Junior Verteilung der prozentualen Read-Methylierung	110
Tabelle 37: Roche GS Junior Epimutationsraten der beiden elterlichen Allele	112
Tabelle 38: Roche GS Junior paternale Methylierung und Epimutationsrate	114
Tabelle 39: p-Werte für die Methylierung und ER des paternalen Allels	115
Tabelle 40: Illumina MiSeq Run-Parameter	118
Tabelle 41: Illumina MiSeq Methylierung ohne Allel-Unterscheidung	118
Tabelle 42: Illumina MiSeq Methylierung der beiden elterlichen Allele	119
Tabelle 43: Illumina MiSeq Verteilung der prozentualen Read-Methylierung	122
Tabelle 44: Illumina MiSeq Epimutationsraten der beiden elterlichen Allele	124
Tabelle 45: Methylierung im GDM/Kontrollen Vergleich	128
Tabelle 46: Methylierung der elterlichen Allele im GDM/Kontrollen Vergleich	129
Tabelle 47: Epimutationsraten im GDM/Kontrollen Vergleich	131
Tabelle 48: Ergänzende DBS-Methylierungsdaten und korrespondierende Expressionsdaten	190

8 Publikationen und Kongressbeiträge

8.1 Publikationen

Epigenetic signatures of gestational diabetes mellitus on cord blood methylation.

Haertle L, El Hajj N, Dittrich M, Müller T, Nanda I, Lehnen H, Haaf T.

Clin Epigenetics. 2017 Mar 27;9:28. doi: 10.1186/s13148-017-0329-3. eCollection 2017.

DNA methylation signatures in cord blood of ICSI children.

El Hajj N, Haertle L, Dittrich M, Denk S, Lehnen H, Hahn T, Schorsch M, Haaf T.

Hum Reprod. 2017 May 31:1-9. doi: 10.1093/humrep/dex209.

Hypermethylation of the non-imprinted maternal *MEG3* and paternal *MEST* alleles is highly variable among normal individuals.

Haertle L, Maierhofer A, Böck J, Lehnen H, Böttcher Y, Blüher M, Schorsch M, Potabattula R,

El Hajj N, Appenzeller S, Haaf T.

PLoS One, 12, e0184030.

Single CpG hypermethylation and allele methylation errors in tumor suppressor genes in normal body cells of early-onset and high-risk breast cancer patients.

Böck J, Appenzeller S, Haertle L, Schneider T, Gehrig A, Schröder J, Wolf B, Bartram C, Sutter C, Haaf T.

(in preparation)

Paternal body mass index (BMI) effects on sperm methylation and transmission into the next generation

Potabattula R, Schorsch M, Dittrich M, Böck J, Haertle L, Hahn T, El Hajj N*, Haaf T*

* Contributed Equally

(in preparation)

8.2 Kongressbeiträge

Talks oder nominierte Poster:

The unmethylated allele of oppositely imprinted (i.e. *MEST* and *MEG3*) genes is highly susceptible to epimutations during early development and may contribute an additional layer of complexity to phenotypic variation. **Haertle L**, Maierhofer A, Böck J, Appenzeller S, Wolf B, El Hajj N, Lehnen H, Böttcher Y, Blüher M, Schorsch M, Potabattula R, Kuhtz J, Haaf T. Oral presentation: 27th Conference of the German Society of Human Genetics, Lübeck, Germany (2016)

WS9-03: http://beat.wolf.home.hefr.ch/documents/GfH_2016_Tagungsband_final.pdf#page=59

Deep bisulfite sequencing for quantification of constitutive epimutations in tumor suppressor genes. Böck J, **Haertle L**, Appenzeller S, Wolf B, Schneider T, Sutter C, Haaf T. Poster Presentation (nominated): 27th Conference of the German Society of Human Genetics, Lübeck, Germany (2016)

P-Nomin.-002: http://beat.wolf.home.hefr.ch/documents/GfH_2016_Tagungsband_final.pdf#page=59

Epigenetic signatures of gestational diabetes mellitus on *ATP5A1*, *PRKCH*, *SLC17A4*, and *HIF3A* cord blood methylation. **Haertle L**, El Hajj N, Dittrich M, Müller T, Nanda I, Lehnen H, Haaf T. Poster Presentation (nominated): 28th Conference of the German Society of Human Genetics, Bochum, Germany (2017)

P-BasEpi-012: http://www.gfhev.de/de/kongress/009_Abstractband_gesamt.pdf

Paternal body mass index (BMI) effects on sperm methylation and transmission into the next generation. Potabattula R, Schorsch M, Dittrich M, Böck J, **Haertle L**, Hahn T, El Hajj N, Haaf T. Oral presentation: 28th Conference of the German Society of Human Genetics, Bochum, Germany (2017)

WS9-001: http://www.gfhev.de/de/kongress/009_Abstractband_gesamt.pdf

9 Anhang

Tabelle 48: Ergänzende DBS-Methylierungsdaten und korrespondierende Expressionsdaten

Gen	Gewebe (ID)	Geschlecht	Methylierung									Expression		
			Maternales Allel			Paternales Allel			Beide Allele			$\Delta\Delta\text{Ct}$ Wert	ΔCt SE	
			SNP	\emptyset Meth.	Epimutationsrate	SNP	\emptyset Meth.	Epimutationsrate	SNP Ratio	Reads	\emptyset Meth.			
Roche GSJunior														
MEG3 IG-DMR	VAT 1	weiblich	G	36,0	20,7	A	95,3	4,0	0,84	866	68,2	-0,050	0,045	
	VAT 2	weiblich	A	52,0	52,1	G	96,0	2,8	0,72	767	70,4			
	VAT 3	weiblich	A	29,6	25,4	G	91,4	5,1	0,56	762	51,6	0,939	0,133	
	VAT 4	männlich	G	35,1	30,3	A	93,1	5,2	0,99	308	63,9			
	VAT 5	männlich	A	33,2	30,0	G	93,5	6,0	0,4	290	50,5			
	VAT 6	männlich	G	19,3	7,8	A	94,5	5,2	0,85	779	59,8	0,000	0,060	
	VAT 7	weiblich	G	20,1	12,4	A	94,0	4,3	0,87	1041	59,7			
	VAT 8	weiblich	G	34,3	28,4	A	95,0	3,2	0,81	849	67,8	-0,235	0,061	
	VAT 9	männlich	G	23,9	17,5	A	86,9	11,4	0,94	992	56,4	-3,673	0,053	
	VAT 10	weiblich	A	30,5	21,9	G	91,6	8,1	0,71	774	55,8			
	VAT 11	weiblich	G	29,8	21,4	A	84,3	14,7	0,81	812	59,9	-0,967	0,044	
	VAT 12	weiblich	A	19,8	12,3	G	94,5	3,9	0,78	999	52,5	0,244	0,036	
	VAT 13	männlich	A	20,0	14,9	G	95,4	3,4	0,75	832	52,4			
	AB 1	weiblich	G	28,5	20,1	A	94,3	4,6	0,84	916	64,1			
AB 2	weiblich	A	33,0	28,2	G	84,0	15,2	0,76	838	55,2				
AB 3	weiblich	A	28,1	21,0	G	91,9	7,0	0,68	781	54,0				
AB 4	männlich	A	25,6	17,2	G	95,3	3,1	0,58	696	51,1				
AB 5	männlich	G	27,1	14,6	A	94,8	4,4	0,85	671	63,7				
AB 6	weiblich	G	24,3	17,7	A	95,0	3,7	0,68	867	66,4				
AB 7	weiblich	G	32,3	25,5	A	94,9	4,6	0,77	883	67,6				
AB 8	männlich	G	21,4	14,3	A	91,9	7,7	0,76	1070	61,5				
AB 9	männlich	A	26,1	14,7	G	94,2	3,7	0,68	730	53,8				
AB 10	weiblich	A	26,5	21,2	G	93,2	6,2	0,74	764	54,7				
AB 11	weiblich	G	18,8	10,0	A	94,4	3,6	0,72	1006	62,8				
AB 12	weiblich	A	25,6	20,9	G	95,1	2,1	0,63	871	52,4				
AB 13	männlich	A	30,8	22,7	G	92,7	6,3	0,55	540	53,0				
AB 14	männlich	A	44,7	43,8	G	90,6	7,1	0,65	607	62,8				

AB 15	weiblich	G	59,5	65,5	A	93,6	3,2	0,76	764	79,1
AB 16	männlich	A	21,7	16,3	G	95,4	3,2	0,76	646	53,6
AB 17	männlich	A	34,4	27,7	G	95,1	2,1	0,96	826	65,4
AB 18	weiblich	A	31,4	27,9	G	93,3	1,9	0,49	165	51,6
AB 19	weiblich	G	30,3	20,7	A	91,3	7,0	0,96	474	61,4
AB 20	weiblich	A	35,1	27,4	G	93,4	5,0	0,65	714	58,0
AB 21	männlich	A	26,0	16,0	G	91,7	6,8	0,71	748	53,3
AB 22	männlich	G	36,5	30,0	A	92,3	5,7	0,8	1262	67,4
AB 23	männlich	G	23,3	13,2	A	92,9	6,5	0,92	650	59,6
FCB 1	weiblich	A	20,9	9,7	G	95,0	2,0	0,92	731	56,4
FCB 2	männlich	G	19,9	10,9	A	92,4	6,3	0,85	1022	59,0
FCB 3	weiblich	G	18,9	13,7	A	89,8	8,8	0,98	998	54,6
FCB 4	weiblich	G	24,7	14,9	A	87,3	12,6	0,87	1011	58,1
FCB 5	männlich	A	22,3	7,0	G	93,4	5,0	0,45	766	44,4
FCB 6	weiblich	A	20,7	5,6	G	96,8	2,6	0,79	958	54,3
FCB 7	weiblich	A	22,4	12,2	G	94,1	5,1	0,69	966	51,8
FCB 8	weiblich	G	16,9	4,6	A	89,1	9,7	0,98	1227	53,4
FCB 9	weiblich	G	19,4	9,3	A	89,4	9,8	0,62	817	62,9
FCB 10	weiblich	G	22,9	13,1	A	93,1	6,3	0,98	483	57,6
FCB 11	weiblich	A	22,9	13,6	G	91,3	9,0	0,76	181	52,4
FCB 12	weiblich	A	24,0	20,5	G	94,8	3,7	0,87	576	56,9
FCB 13	männlich	A	26,5	17,9	G	90,0	9,8	0,56	482	49,1
FCB 14	männlich	G	26,6	16,7	A	86,8	11,8	0,86	869	58,9
FCB 15	weiblich	A	25,4	14,8	G	87,4	12,1	0,84	1233	53,7
FCB 16	männlich	A	23,6	11,5	G	94,6	3,0	0,75	547	53,9
FCB 17	weiblich	G	18,8	10,8	A	98,0	1,1	0,71	157	65,2
FCB 18	männlich	G	23,4	16,7	A	86,7	12,8	0,98	962	54,8
FCB 19	männlich	A	23,3	12,0	G	95,0	3,7	0,6	931	50,1
FCB 20	weiblich	G	20,7	9,2	A	93,0	6,0	0,97	949	57,4
FCB 21	männlich	A	29,1	20,2	G	94,3	4,4	0,56	960	52,5
FCB 22	weiblich	G	29,6	22,1	A	92,8	5,0	0,85	1380	63,8
FCB 23	weiblich	A	22,1	13,7	G	95,5	4,1	0,88	1044	56,1
FCB 24	weiblich	A	22,1	12,1	G	93,3	5,2	0,69	947	51,6
FCB 25	männlich	A	24,1	15,6	G	95,9	2,4	0,72	814	54,2
FCB 26	männlich	G	24,9	20,4	A	93,3	5,6	0,97	568	59,5
FCB 27	männlich	G	21,3	10,7	A	91,8	6,4	0,90	650	58,4
FCB 28	männlich	A	23,2	12,3	G	89,9	8,7	0,64	294	49,5

	FCB 29	männlich	G	24,2	14,4	A	90,3	8,7	0,78	1065	61,3		
	FCB 30	männlich	A	25,8	17,0	G	92,4	6,8	0,81	459	55,9		
MEST Promotor	VAT 1	männlich	G	97,3	1,1	A	11,0	7,9	0,74	638	47,7	-2,273	0,051
	VAT 2	weiblich	A	95,6	2,3	G	10,5	6,1	0,83	754	49,1		
	VAT 3	weiblich	A	95,4	1,6	G	8,7	4,5	0,96	649	51,1	-0,154	0,063
	VAT 4	weiblich	G	96,9	1,3	A	21,0	17,7	0,88	570	61,5	-2,985	0,053
	VAT 5	männlich	A	95,4	1,9	G	10,7	8,4	0,77	738	47,5		
	VAT 6	weiblich	A	93,4	3,1	G	6,1	3,2	0,64	1070	40,2	0,061	0,075
	VAT 7	weiblich	A	94,6	3,2	G	13,5	9,8	0,87	862	51,2	1,292	0,055
	VAT 8	männlich	A	94,9	3,6	G	7,1	3,1	0,81	933	46,5	0,000	0,130
	VAT 9	männlich	G	95,8	2,2	A	11,4	7,6	0,88	780	50,8	1,359	0,034
	VAT 10	männlich	G	96,5	1,5	A	13,6	9,8	0,91	513	56,9	-0,210	0,035
	VAT 11	männlich	A	95,3	2,5	G	5,2	2,7	0,86	696	46,9	-0,098	0,035
	VAT 12	weiblich	A	95,5	2,4	G	7,8	4,1	0,79	658	46,6	1,424	0,032
	VAT 13	weiblich	A	94,8	2,3	G	12,6	8,0	0,92	919	52,1	-1,426	0,037
	VAT 14	männlich	G	94,1	2,8	A	10,8	6,1	0,92	681	54,2	0,979	0,029
	VAT 15	männlich	A	94,5	2,4	G	8,1	5,2	0,86	820	48,0	0,473	0,033
	VAT 16	männlich	A	95,6	2,4	G	9,4	5,7	0,92	913	50,8		
	VAT 17	männlich	A	98,1	0,3	G	5,8	1,9	0,90	616	49,5	-1,269	0,098
	VAT 18	weiblich	G	96,2	1,0	A	10,2	8,0	0,84	713	56,9	-2,322	0,060
	VAT 19	männlich	G	96,1	1,8	A	8,4	3,9	0,95	705	51,1	-0,404	0,051
	VAT 20	weiblich	G	94,9	1,8	A	15,6	13,0	0,69	581	62,5	-2,317	0,069
	VAT 21	männlich	G	95,7	2,0	A	12,8	10,7	0,97	685	54,8		
	VAT 22	weiblich	G	94,2	3,3	A	14,5	9,8	0,90	894	52,2	-0,912	0,037
	VAT 23	weiblich	G	96,4	1,3	A	8,2	4,4	0,77	887	46,5	-0,375	0,047
	VAT 24	männlich	G	95,3	2,3	A	22,7	19,8	0,65	939	51,3	-0,593	0,039
AB 1	weiblich	A	94,9	2,4	G	9,6	7,1	0,84	1392	48,5			
AB 2	männlich	A	94,9	2,2	G	14,0	11,8	0,73	1180	60,7			
AB 3	weiblich	G	93,5	3,7	A	18,3	15,4	0,87	1207	53,3			
AB 4	weiblich	A	93,3	4,5	G	7,7	5,4	0,62	1507	40,3			
AB 5	männlich	G	90,2	5,8	A	50,3	57,6	0,94	1473	70,8			
AB 6	männlich	A	94,1	3,7	G	16,3	11,6	0,95	850	56,2			
AB 7	weiblich	A	94,5	2,7	G	8,4	5,1	0,82	1090	55,7			
AB 8	männlich	G	92,7	5,3	A	8,2	5,3	0,36	1419	30,8			
AB 9	männlich	A	92,5	4,5	G	6,4	3,8	0,44	1455	32,7			
AB 10	weiblich	G	94,4	2,0	A	17,2	16,7	0,49	1512	42,7			
AB 11	weiblich	A	94,8	2,7	G	20,8	19,4	0,85	1318	60,9			

AB 12	männlich	A	95,7	1,6	G	10,3	6,7	0,87	1084	50,0
AB 13	weiblich	A	95,4	1,4	G	22,2	19,7	0,92	1243	57,1
AB 14	männlich	G	95,1	2,1	A	14,2	11,5	0,89	1032	52,2
AB 15	weiblich	A	94,6	2,9	G	14,2	11,6	0,87	1754	57,3
AB 16	männlich	G	94,3	2,5	A	9,1	7,1	0,65	1349	42,5
AB 17	männlich	G	95,8	1,9	A	35,5	34,4	0,78	1138	69,3
AB 18	männlich	A	94,7	2,6	G	11,2	8,8	0,88	1636	55,6
AB 19	weiblich	A	92,6	5,5	G	5,9	3,6	0,52	1451	35,4
AB 20	männlich	G	94,8	2,0	A	10,1	7,6	0,68	1508	44,4
AB 21	männlich	G	96,6	1,8	A	17,0	16,3	0,84	1214	53,4
AB 22	weiblich	A	94,9	2,3	G	11,3	8,6	0,85	1425	49,7
AB 23	männlich	A	93,3	4,3	G	9,8	6,7	0,82	1201	47,4
AB 24	weiblich	G	96,4	1,4	A	15,7	11,8	0,90	1495	53,9
AB 25	weiblich	A	93,7	4,0	G	21,6	20,2	0,98	839	57,9
AB 26	männlich	G	90,9	9,1	A	19,9	20,0	0,44	72	41,6
AB 27	männlich	G	95,4	1,7	A	14,2	12,7	0,84	1380	51,3
AB 28	weiblich	A	96,2	1,5	G	16,0	12,9	0,95	1092	55,1
AB 29	weiblich	G	94,4	1,8	A	13,0	9,7	0,90	825	51,5
AB 30	männlich	A	92,1	3,8	G	11,1	9,1	0,60	1043	41,6
AB 31	weiblich	G	92,7	2,6	A	29,4	24,8	0,92	240	59,7
AB 32	weiblich	A	93,0	3,2	G	18,9	6,8	0,83	1327	52,6
AB 33	weiblich	A	91,6	4,4	G	9,8	6,0	0,45	1522	32,9
AB 34	weiblich	A	90,9	4,8	G	7,5	4,0	0,55	502	28,4
AB 35	weiblich	A	91,4	4,9	G	10,8	6,3	0,55	1033	39,4
AB 36	weiblich	A	88,7	5,6	G	7,0	2,3	0,20	1279	27,0
FCB 1	weiblich	G	95,9	0,9	A	26,1	22,7	0,64	826	53,5
FCB 2	weiblich	G	95,0	0,7	A	37,8	38,8	0,89	1055	68,1
FCB 3	weiblich	A	97,8	0,6	G	16,5	12,6	0,85	1048	60,1
FCB 4	weiblich	A	97,2	0,0	G	14,5	11,1	0,92	692	57,3
FCB 5	weiblich	A	97,4	0,7	G	26,2	25,9	0,96	835	62,5
FCB 6	weiblich	G	96,1	0,9	A	41,2	43,2	0,67	973	74,0
FCB 7	weiblich	A	96,2	1,7	G	15,6	11,6	0,70	1089	62,9
FCB 8	weiblich	A	96,1	0,8	G	16,8	11,7	0,75	677	62,1
FCB 9	männlich	A	96,2	1,4	G	29,0	15,7	0,95	1016	57,6
FCB 10	männlich	G	94,2	2,9	A	16,3	12,0	0,94	999	56,3
FCB 11	männlich	G	95,0	1,2	A	28,8	25,9	0,86	945	64,5
FCB 12	männlich	G	81,5	14,6	A	38,3	37,4	0,94	1056	65,0

FCB 13	männlich	G	92,8	5,3	A	12,7	7,4	0,76	480	47,4
FCB 14	weiblich	G	89,3	6,3	A	18,8	14,7	0,62	703	45,7
FCB 15	männlich	G	96,2	1,4	A	23,6	18,7	0,96	1198	59,2
FCB 16	weiblich	G	93,4	2,6	A	17,3	12,5	0,71	644	48,9
FCB 17	männlich	A	87,7	9,4	G	24,0	14,8	0,60	1613	45,7
FCB 18	männlich	A	97,0	0,9	G	12,5	4,3	0,86	1223	51,5
FCB 19	weiblich	G	94,0	2,9	A	28,5	24,3	0,88	1946	59,2
FCB 20	männlich	G	98,7	0,2	A	10,9	10,5	0,39	782	73,4
FCB 21	männlich	G	94,9	2,5	A	28,8	27,9	0,44	1246	55,3
FCB 22	weiblich	G	92,2	4,3	A	14,0	11,6	0,38	1172	35,7
FCB 23	weiblich	A	81,9	15,4	G	8,6	4,9	0,32	1137	26,2
FCB 24	weiblich	G	85,8	10,1	A	8,9	3,5	0,15	1048	19,1
FCB 25	weiblich	A	94,0	3,8	G	6,3	3,1	0,35	1311	29,1
FCB 26	weiblich	G	91,3	4,4	A	10,2	5,7	0,12	835	18,9
FCB 27	weiblich	G	87,9	8,3	A	8,8	4,0	0,12	1281	17,0
FCB 28	weiblich	A	83,3	12,6	G	10,0	5,1	0,19	2067	21,5
FCB 29	männlich	A	95,6	1,4	G	6,5	2,1	0,43	1222	33,3
FCB 30	weiblich	A	93,2	2,6	G	13,4	7,6	0,43	1421	37,2
FCB 31	männlich	G	91,9	4,5	A	21,3	16,8	0,36	1083	40,0
FCB 32	weiblich	A	95,5	2,0	G	12,7	11,0	0,69	990	38,6
FCB 33	weiblich	G	94,9	1,1	A	44,5	44,9	0,71	1002	66,9
FCB 34	weiblich	G	96,6	0,0	A	22,2	13,6	0,55	68	48,5
FCB 35	männlich	G	96,6	0,8	A	42,2	43,0	0,83	880	71,9
FCB 36	männlich	G	86,1	12,9	A	58,5	61,5	0,85	886	73,4
FCB 37	männlich	A	97,6	0,8	G	10,8	7,0	0,64	1863	63,9
FCB 38	männlich	A	97,8	0,7	G	25,6	23,7	0,81	611	57,9
FCB 39	weiblich	A	97,7	0,3	G	9,3	5,2	0,87	1163	56,6
FCB 40	weiblich	G	96,0	1,0	A	21,7	17,3	0,87	1304	61,4
FCB 41	weiblich	G	96,3	0,8	A	37,0	36,7	0,94	1002	67,6
FCB 42	weiblich	A	95,8	1,6	G	16,8	12,2	1,00	1390	56,2
FCB 43	weiblich	G	96,6	0,2	A	33,5	29,7	0,88	805	67,0
FCB 44	weiblich	G	96,4	0,6	A	44,5	46,4	0,89	751	69,0
FCB 45	männlich	A	85,9	12,2	G	33,2	33,4	0,69	1049	54,6
FCB 46	weiblich	A	97,1	0,6	G	29,0	28,6	0,53	1115	73,6
FCB 47	weiblich	A	89,9	6,6	G	5,4	2,4	0,11	1106	13,5
FCB 48	männlich	A	84,4	12,8	G	5,4	2,8	0,42	1045	31,9
FCB 49	männlich	A	92,0	6,4	G	7,6	4,5	0,46	979	44,5

	FCB 50	weiblich	G	94,6	1,5	A	31,5	31,5	0,64	988	56,0
Illumina MiSeq											
MEG3 IG- DMR	FCB 1	weiblich	G	19,3	14,1	A	92,2	6,3	0,63	96542	47,4
	FCB 2	weiblich	G	25,9	25,9	A	93,5	6,6	0,76	57108	64,3
	FCB 3	weiblich	G	21,1	14,0	A	94,7	4,2	0,72	68561	52,0
	FCB 4	weiblich	G	28,2	24,5	A	94,9	1,4	0,80	46030	57,8
	FCB 5	männlich	A	21,3	14,2	G	95,4	3,5	0,75	83951	53,2
	FCB 6	männlich	G	25,2	20,6	A	96,1	2,3	0,48	42934	48,2
	FCB 7	weiblich	A	19,8	8,7	G	96,2	2,6	0,83	63640	54,6
	FCB 8	weiblich	G	17,7	10,7	A	96,3	2,9	0,73	61522	50,8
	FCB 9	weiblich	A	21,2	11,6	G	96,3	2,5	0,88	66298	56,4
	FCB 10	männlich	G	13,4	4,9	A	96,3	2,4	0,47	44799	39,8
	FCB 11	weiblich	A	20,0	8,2	G	96,4	1,2	0,82	82505	54,4
	FCB 12	weiblich	G	17,6	12,3	A	96,5	2,6	0,70	46251	50,0
	FCB 13	männlich	A	21,1	11,5	G	96,9	1,6	0,79	106241	54,6
	FCB 14	weiblich	A	23,0	13,4	G	97,0	1,6	0,87	108017	57,4
	FCB 15	weiblich	A	24,0	14,8	G	97,1	1,3	0,68	126975	53,6
	FCB 16	männlich	G	21,8	15,5	A	97,1	1,3	0,64	91889	51,2
	FCB 17	weiblich	A	22,9	12,6	G	97,4	1,1	0,88	56532	57,8
	FCB 18	männlich	A	20,1	9,1	G	97,4	1,2	0,58	45617	48,4
	FCB 19	männlich	A	25,8	15,4	G	97,6	1,0	0,76	70929	56,9
	FCB 20	weiblich	A	26,0	16,0	G	97,8	0,9	0,90	81195	59,9
	FCB 21	weiblich	G	21,6	14,6	A	87,9	11,3	0,80	37529	51,0
	FCB 22	weiblich	G	22,3	18,3	A	91,6	7,0	0,63	21538	49,2
	FCB 23	weiblich	A	17,2	7,6	G	92,7	7,1	0,77	34932	50,0
	FCB 24	weiblich	A	16,9	8,0	G	93,1	4,5	0,69	21096	47,9
	FCB 25	männlich	G	20,1	16,2	A	93,5	4,5	0,65	35427	49,0
	FCB 26	weiblich	A	17,2	9,3	G	93,6	3,6	0,87	38009	52,8
	FCB 27	weiblich	G	24,3	17,8	A	93,9	6,2	0,52	37675	48,1
	FCB 28	männlich	G	20,7	16,8	A	94,8	3,8	0,62	24866	49,0
	FCB 29	weiblich	A	24,4	13,1	G	95,0	4,7	0,56	29650	49,9
	FCB 30	weiblich	G	19,7	15,8	A	95,3	3,3	0,72	35269	51,4
	FCB 31	männlich	A	17,5	8,8	G	95,8	1,1	0,75	26799	51,0
	FCB 32	weiblich	A	22,3	11,6	G	96,0	2,5	0,79	25557	54,8
	FCB 33	weiblich	G	17,4	9,2	A	96,0	1,3	0,62	20817	47,6
	FCB 34	männlich	A	18,7	9,8	G	96,0	2,7	0,82	31476	53,5
	FCB 35	männlich	A	20,7	13,6	G	96,2	3,8	0,84	31939	55,2

	FCB 36	männlich	A	21,9	13,5	G	96,5	2,5	0,49	31832	46,5
	FCB 37	weiblich	A	27,2	18,8	G	96,8	1,7	0,74	25967	56,7
	FCB 38	weiblich	G	22,6	19,0	A	96,9	1,5	0,62	33211	51,0
	FCB 39	weiblich	G	17,3	11,5	A	97,2	1,3	0,60	21382	47,3
	FCB 40	weiblich	A	23,0	11,5	G	97,9	1,1	0,76	25685	55,2
	FCB 41	weiblich	A	17,7	9,5	G	97,8	1,2	0,62	9160	48,5
	FCB 42	männlich	A	21,6	9,4	G	96,5	2,4	0,62	17551	50,4
	FCB 43	männlich	A	22,8	13,3	G	98,1	0,9	0,60	12625	51,0
	FCB 44	männlich	G	21,0	17,8	A	96,1	2,9	0,73	19464	52,7
	FCB 45	-	G	19,9	17,3	A	89,4	9,9	0,84	10607	51,6
MEG3 Promotor	FCB 1	weiblich	T	3,1	1,8	G	91,8	0,2	0,42	10546	65,7
	FCB 2	männlich	G	2,0	0,6	T	92,9	0,7	0,80	23786	52,6
	FCB 3	weiblich	G	18,5	5,7	T	93,8	0,6	0,93	19736	57,6
	FCB 4	männlich	G	23,7	22,5	T	96,5	0,5	0,51	18289	72,0
	FCB 5	weiblich	G	6,4	0,9	T	95,8	0,8	0,65	11546	60,6
	FCB 6	männlich	T	4,1	2,5	G	95,2	0,5	0,56	13563	62,3
	FCB 7	männlich	G	23,8	22,6	T	97,0	0,5	0,51	12861	93,2
	FCB 8	weiblich	T	4,5	2,1	G	96,1	0,5	0,37	24920	71,6
	FCB 9	männlich	G	6,4	2,5	T	95,5	1,1	0,44	15864	68,1
	FCB 10	männlich	T	6,8	4,6	G	95,6	0,6	0,30	21692	75,0
	FCB 11	männlich	T	16,0	2,6	G	93,7	1,2	0,99	20895	54,7
	FCB 12	männlich	T	4,0	1,5	G	94,6	2,5	0,46	23011	66,1
	FCB 13	weiblich	G	54,8	54,5	T	93,2	3,9	0,92	19010	73,2
	FCB 14	männlich	G	4,4	1,4	T	94,5	1,3	0,45	11282	66,7
	FCB 15	weiblich	G	11,5	8,4	T	95,9	0,6	0,42	16672	70,8
	FCB 16	männlich	G	6,0	4,9	T	94,8	0,6	0,50	15240	65,2
	FCB 17	weiblich	T	5,4	3,0	G	95,2	0,7	0,42	14450	68,7
	FCB 18	männlich	G	4,8	2,1	T	96,7	0,3	0,30	7814	75,3
	FCB 19	weiblich	T	20,7	3,7	G	95,9	0,5	0,59	9638	68,1
	FCB 20	weiblich	T	7,4	4,9	G	95,5	1,0	0,28	9677	76,4
	FCB 21	weiblich	T	6,2	4,1	G	95,2	0,3	0,27	7686	76,1
	FCB 22	männlich	G	3,6	1,1	T	94,1	0,7	0,41	23966	68,0
	FCB 23	männlich	G	4,9	2,7	T	93,6	1,0	0,71	4556	56,9
	FCB 24	männlich	G	7,0	4,7	T	93,6	0,6	0,59	10011	61,6
	FCB 25	männlich	G	4,2	0,5	T	94,9	1,2	0,91	7397	47,5
	FCB 26	weiblich	T	2,7	1,0	G	94,2	0,7	0,70	4187	56,6
	FCB 27	männlich	T	4,5	2,7	G	92,4	2,7	0,46	6115	64,8

	FCB 28	weiblich	T	1,9	0,4	G	95,8	0,4	0,81	4915	53,8
	FCB 29	männlich	G	2,8	0,3	T	97,2	0,1	0,90	6124	52,5
	FCB 30	weiblich	G	2,1	0,8	T	95,7	0,6	0,74	4845	55,9
	FCB 31	weiblich	T	4,7	1,8	G	92,3	3,8	0,64	6313	58,1
MEST Promotor	FCB 1	männlich	G	97,5	0,3	A	28,4	26,7	0,68	75600	56,4
	FCB 2	weiblich	G	96,1	0,7	A	23,1	16,2	0,94	33971	60,7
	FCB 3	männlich	A	97,1	0,7	G	12,2	8,0	0,84	47917	50,8
	FCB 4	männlich	A	95,6	3,4	G	13,2	12,4	0,91	31391	52,5
	FCB 5	männlich	A	98,9	0,3	G	7,7	0,7	0,78	33682	59,0
	FCB 6	männlich	A	93,7	4,6	G	14,2	10,5	0,80	48379	49,6
	FCB 7	männlich	A	97,0	0,4	G	16,8	12,5	0,79	39400	52,4
	FCB 8	weiblich	A	98,0	0,3	G	12,6	5,9	0,73	38374	48,8
	FCB 9	weiblich	G	97,0	0,3	A	29,4	27,0	0,79	41692	59,6
	FCB 10	weiblich	A	96,0	0,7	G	14,9	9,5	0,87	21891	52,8
	FCB 11	weiblich	G	97,0	0,5	A	38,7	38,2	0,80	29498	64,7
	FCB 12	weiblich	G	96,5	0,5	A	31,5	27,7	0,80	38691	60,4
	FCB 13	weiblich	G	97,0	0,8	A	38,7	39,8	0,62	30379	61,0
	FCB 14	männlich	G	93,1	4,6	A	42,1	41,7	0,53	25105	59,9
	FCB 15	weiblich	A	97,6	0,5	G	9,5	4,1	0,84	16491	49,9
	FCB 16	weiblich	G	97,6	0,5	A	31,3	29,7	0,84	19280	61,5
	FCB 17	weiblich	A	93,4	3,4	G	7,2	1,0	1,00	2139	50,4
	FCB 18	weiblich	G	96,3	0,8	A	19,7	13,6	0,81	3871	53,9
	FCB 19	weiblich	A	97,7	0,5	G	25,5	22,3	0,60	4144	52,6
	FCB 20	weiblich	A	97,2	0,5	G	20,7	16,3	0,73	4120	53,0
	FCB 21	weiblich	A	98,3	0,4	G	14,2	7,7	0,34	4343	35,8
	FCB 22	weiblich	G	97,6	0,7	A	26,9	23,7	0,33	2773	44,5
	FCB 23	weiblich	A	97,6	0,2	G	30,2	27,1	0,53	3240	53,7
	FCB 24	männlich	G	95,5	1,8	A	11,7	5,6	0,81	3052	49,2
	FCB 25	männlich	G	82,1	12,8	A	42,0	35,1	0,80	2028	59,8
	FCB 26	weiblich	A	96,4	1,2	G	19,5	14,1	0,64	12563	49,5
	FCB 27	weiblich	G	94,3	1,8	A	31,6	29,3	0,73	19344	58,1
	FCB 28	männlich	G	87,5	12,7	A	28,4	29,5	0,76	14823	54,0
	FCB 29	männlich	A	91,0	6,6	G	27,9	23,2	0,88	16439	61,4
	FCB 30	weiblich	G	94,7	2,4	A	22,4	14,9	0,93	70456	57,3
	FCB 31	weiblich	G	95,7	1,4	A	35,5	33,6	0,56	53291	57,1
	FCB 32	weiblich	A	97,8	0,5	G	21,3	16,9	0,73	51340	53,5
	FCB 33	weiblich	G	98,0	0,2	A	39,1	41,8	0,84	38763	66,0

	FCB 34	männlich	A	97,3	0,3	G	28,9	27,1	0,59	68287	54,3
	FCB 35	weiblich	A	96,4	0,8	G	20,9	15,3	0,72	41703	52,4
	FCB 36	männlich	G	97,6	1,1	A	17,8	10,9	0,92	34648	56,1
	FCB 37	weiblich	A	95,7	1,7	G	13,1	8,1	0,70	11908	47,1
	FCB 38	weiblich	A	97,5	0,9	G	24,3	22,2	0,72	12087	54,9
	FCB 39	weiblich	A	96,0	0,9	G	12,9	9,7	0,73	18955	48,1
	FCB 40	männlich	G	94,2	2,2	A	26,7	21,9	0,71	12700	54,7
	FCB 41	weiblich	G	95,8	0,8	A	29,1	26,3	0,82	2494	59,1
	FCB 42	männlich	A	95,9	1,7	G	11,4	5,8	0,74	3726	47,3
	FCB 43	weiblich	G	97,7	0,5	A	29,8	27,0	0,69	3174	57,5
	FCB 44	weiblich	G	96,9	1,1	A	33,0	32,4	0,57	2963	56,1
	FCB 45	weiblich	G	95,1	0,5	A	19,3	13,1	0,61	5870	48,0
	FCB 46	männlich	A	97,5	1,2	G	7,2	3,7	0,63	3781	42,3
	FCB 47	-	G	98,6	0,5	A	5,6	1,3	0,74	2336	45,1
	FCB 48	weiblich	G	96,1	0,7	A	21,1	21,0	0,72	3578	52,4
	FCB 49	-	G	90,6	2,4	A	30,6	30,1	0,65	5171	54,2
	FCB 50	weiblich	A	95,7	0,9	G	12,6	9,0	0,38	2570	35,5
	FCB 51	weiblich	G	97,8	0,3	A	22,7	15,8	0,53	2283	48,8
	FCB 52	weiblich	G	95,7	0,8	A	26,4	21,6	0,54	6843	50,6
	FCB 53	weiblich	G	97,0	0,5	A	27,7	25,0	0,70	7745	56,3
	FCB 54	männlich	A	93,6	1,7	G	13,1	9,7	0,85	5198	50,0
	FCB 55	männlich	G	95,5	1,5	A	23,5	20,8	0,47	9667	46,6
	FCB 56	männlich	A	97,6	0,3	G	13,4	7,9	0,36	3413	35,7
	FCB 57	männlich	G	95,9	1,6	A	15,6	11,0	0,67	3406	47,8
	FCB 58	weiblich	G	84,8	13,6	A	20,0	18,9	0,90	2866	54,1
PEG3 Promotor	FCB 1	weiblich	G	97,0	1,0	A	4,3	1,5	0,63	72914	61,1
	FCB 2	-	A	93,6	0,8	G	3,6	0,9	0,48	59955	64,4
	FCB 3	männlich	A	97,4	0,2	G	5,6	0,3	0,60	33754	63,0
	FCB 4	männlich	A	94,3	1,9	G	3,9	0,4	0,80	56053	54,2
	FCB 5	weiblich	A	95,8	1,0	G	7,5	4,7	0,45	49570	68,4
	FCB 6	männlich	G	93,4	3,7	A	2,7	0,6	0,60	39163	59,5
	FCB 7	weiblich	A	95,6	1,1	G	4,3	1,2	0,67	77415	58,8
	FCB 8	weiblich	A	98,0	0,3	G	19,4	17,3	0,95	43503	57,7
	FCB 9	weiblich	A	95,8	1,2	G	3,6	0,7	0,49	45740	65,6
	FCB 10	männlich	A	95,0	1,1	G	3,1	0,6	0,58	38237	61,1
	FCB 11	männlich	A	96,3	0,5	G	3,0	0,7	0,77	34305	55,8
	FCB 12	männlich	G	94,0	5,4	A	15,6	14,0	0,72	42592	61,2

FCB 13	weiblich	A	96,7	0,7	G	6,4	3,3	0,55	68966	64,7
FCB 14	-	G	92,2	0,6	A	9,8	0,6	0,67	12577	59,2
FCB 15	männlich	A	96,0	6,2	G	2,5	12,8	0,66	38934	58,7
FCB 16	männlich	A	91,4	0,3	G	14,4	0,6	0,49	41038	66,1
FCB 17	männlich	A	96,8	0,3	G	5,0	0,5	0,60	37184	62,5
FCB 18	männlich	A	98,1	1,0	G	5,1	0,7	0,51	22013	66,8
FCB 19	weiblich	A	95,9	0,4	G	4,6	1,0	0,53	23356	64,3
FCB 20	weiblich	A	97,6	0,8	G	3,7	1,7	0,46	31064	67,9
FCB 21	weiblich	A	96,2	2,4	G	3,9	7,9	0,43	22667	68,5