全基因组甲基化差异分析发现OSBPL5甲基化异常可能在Silver-Russell综合征中有致病作用

吴迪, 巩纯秀*, 苏畅

国家儿童医学中心, 首都医科大学附属北京儿童医院内分泌遗传代谢科, 北京 100045

* 联系人, E-mail: chunxiugong@sina.com

收稿日期: 2018-06-15; 接受日期: 2018-07-08; 网络版发表日期: 2018-09-06

国家自然科学基金(批准号: 81670713)、首都医科大学基础-临床科研合作基金(批准号: 14JL75)和金赛儿科中青年内分泌医师科研基金资助

摘要 Silver-Russell综合征(SRS)是一组临床和遗传异质性疾病. 主要临床表现为低出生体重、严重矮小、极低BMI、三角脸、肢体不对称等. SRS是表观遗传疾病的典型代表. 38%~62%患者有染色体11p15 *IGF2-H19*基因簇印记控制区1 (ICR1)低甲基化, 7%~10%患者有第7号染色体母源单亲二倍体(UPD7(mat)). 另有约40%病因不清. 本研究通过Illumina Methylation 450K芯片检测全基因组甲基化差异分析, 旨在了解是否存在与SRS致病性相关的未知基因或印记基因, 以及能否通过全基因组甲基化检测精细定位SRS低甲基化位置. 选取临床确诊的7例SRS患儿, 其中MLPA方法发现甲基化异常2例、未发现异常5例. 年龄匹配的正常儿童5例作对照, 通过Illumina 450K Infinium Methylation BeadChip芯片检测全基因组甲基化位点, 并用经典的焦磷酸盐测序及数字PCR定量2种方法进行验证. 甲基化位点探针筛选差异位点的标准同时满足: Adjust Pval $\leq$ 0.05, 如果Adjust Pval $\geq$ 0.05, 则参考校正之前的Pval, 该数值需要 $\leq$ 0.05; case vs. control Beta-Difference不小于0.2. 即|Beta-Difference| $\geq$ 0.2. 在484821个探针位点中共筛选出116个差异性甲基化位点. 通过GO Pathway功能分析, 本芯片研究再次证实经典的H19/IGF2低甲基化特征是SRS主要的表观遗传改变. 并且发现1个位于染色体11p14印记基因*OSBPL5*的cg25963939位点, 在实验组与正常对照组有最显著的甲基化差异($P=0.023$, β 值 -0.243). 经用经典焦磷酸盐测序及数字PCR定量分析两种方法进行验证, 证实实验组与对照组*OSBPL5*的cg25963939位点的甲基化存在差异, 提示与SRS致病性相关. 本研究还发现, *TGF β 3*, *HSF1*, *GAP43*, *NOTCH4*, *MYH14*上述5个基因在实验组与对照组存在明显的甲基化差异, 通过GO pathway功能分析, 有可能与SRS致病相关. 本研究通过全基因组甲基化芯片检测, 焦磷酸盐测序及数字PCR定量两种方法验证, 发现11p14的印记基因*OSBPL5* 5' UTR区cg25963939位点, 有可能为SRS发病机制之一. 本研究通过Illumina 450K Infinium高密度微阵列甲基化水平检测, 再次证实SRS最主要的表观遗传甲基化改变最主要定位于11p1区.

关键词 Silver-Russell综合征, 印记基因, 甲基化差异

引用格式: 吴迪, 巩纯秀, 苏畅. 全基因组甲基化差异分析发现OSBPL5甲基化异常可能在Silver-Russell综合征中有致病作用. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 953–961, doi: [10.1360/N052018-00128](https://doi.org/10.1360/N052018-00128)
英文版见: Wu D, Gong C X, Su C. Genome-wide analysis of differential DNA methylation in Silver-Russell syndrome. Sci China Life Sci, 2017, 60: 692–699, doi: [10.1007/s11427-017-9079-7](https://doi.org/10.1007/s11427-017-9079-7)

Silver-Russell综合征(Silver-Russell syndrome, SRS)是一组临床和遗传异质性疾病。其在西方国家的发生率为1/3000~1/100000^[1]。以严重的宫内及生后生长发育受限为主要表现,同时可表现为低出生体重、严重矮小、极低BMI、三角脸、前额突出、小下颌、相对大头畸形及肢体、颅面部不对称等,其他可存在第五小指内向侧弯、并指等^[2]。一些患者还可存在喂养困难、胃食管反流、低血糖、运动及认知障碍等^[2,3]。由于本病临床表现差异很大,其诊断准确性常取决于临床医生的经验。SRS患者骨骼不对称随年龄增长逐渐减轻以及成人面部特征不典型使得临床诊断更困难,导致部分临床特征不明显的患者被漏诊。故其分子生物学诊断很重要。

SRS是表观遗传疾病的典型代表,7%~10%患有第7号染色体母源单亲二倍体(maternal uniparental disomy of chromosome 7(mat))、38%~62%患者有染色体11p15 *IGF2-H19*基因簇 $ICR1$ 低甲基化,其他异常还有染色体结构微观改变、拷贝数变异等,主要在第11号和第7号染色体^[2,4]。此外,SRS患者有多种基因簇的甲基化缺陷(multilocus methylation defects MLMD),大约9% $ICR1$ 和 $ICR2$ 同时低甲基化,母源和父源印记基因簇均可受影响^[5~7]。

印记基因簇的调控表达主要通过印记控制区域的甲基化差异展现。DNA甲基化本身是有规律可循的^[8~12]。前期用甲基化特异性的多重连接依赖的探针扩增技术(methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification, MS-MLPA)检测40例SRS患儿染色体11p15印记缺陷,显示57.5% (23/40) SRS患儿父源染色体11p15 $ICR1$ 低甲基化。另有5% (1/20) UPD(7) mat。尚有38.5% SRS患者原因不清^[13]。那么他们是否

存在其他基因或印记基因的低甲基化呢? 以及染色体11p15 $ICR1$ 的低甲基化能否通过全基因组甲基化检测精细定位呢? 通过甲基化水平差异变化是否可以寻找SRS的分子标记? 针对此假设利用Illumina Methylation 450K芯片,检测SRS患儿甲基化情况,以期找到SRS患儿基因或印记基因的低甲基化的精细定位。

1 研究对象

选取7例在北京儿童医院确诊的SRS患儿,4男3女,平均年龄: 3.63 ± 1.310 岁。5例(2男3女)年龄匹配的正常儿童作对照,平均年龄: 3.32 ± 1.703 岁。2组年龄比较: $t=0.362$, $P=0.725$ 。

7例SRS曾用MS-MLPA MLPA检测染色体11p15 $ICR1$ 低甲基化及尿素变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术检测UPD(7) mat情况,其中MLPA 2例阳性,5例阴性,1例MLPA阴性但UPD(7) mat阳性。具体情况详见表1。

2 研究方法

(1) DNA样本提取。实验组及对照组患儿各留取静脉血2 mL, EDTA抗凝管。磁珠法基因组DNA提取试剂盒(Magnetic Genomic DNA Kit, Qiagen, 美国)提取血样中的基因组DNA。

(2) 全基因组甲基化检测。Illumina 450K Infinium Methylation BeadChip芯片(Illumina, 美国)可检测人全基因组48万个甲基化位点,是一款适合表观基因组全关联分析(EWAS)研究的全基因组DNA甲基化芯片。450K全基因组甲基化芯片每个探针都有15~25倍重复,每张芯片多达900万个点(9 M),以极高的密度覆盖了

表1 研究对象基本情况

实验组	性别	年龄(岁)	11p15MLPA	UPD(7) mat	对照组	性别	年龄(岁)
C1	男	1.75	(+)	(-)	N1	女	1.17
C2	女	2.67	(+)	(-)	N2	女	2.50
C3	女	2.92	(-)	(-)	N3	男	3.08
C4	男	5.58	(-)	(-)	N4	男	4.17
C5	女	3.75	(-)	(-)	N5	女	5.67
C6	男	4.83	(-)	(-)			
C7	男	3.92	(-)	(+)			

99%的RefSeq基因和96%的CpG岛, 包括启动子区、5' UTR区、第一外显子区、gene body区、3' UTR区、基因间区域以及CpG岛外低密度分布的CpG位点. 基因组DNA进行亚硫酸盐转化; 利用NaOH变性基因组DNA; 将基因组DNA恒温过夜, 进行基因组全扩增; 用随机内切酶酶切扩增产物使DNA片断化; 乙醇沉淀DNA, 重新悬浮DNA; 将DNA片段与芯片进行杂交; 芯片清洗、单碱基延伸、染色; 芯片扫描和数据提取.

(3) 实验质控. Illumina甲基化芯片引入了一系列质控探针监测整个实验过程.

(4) 微阵列数据分析. 将扫描得到的原始数据, 通过GenomeStudio软件, 根据Illumina官方Methylation Analysis Algorithms获得每个位点的原始信号强度值. 然后, 经过对不同荧光、探针类型引起的偏差校正及归一化、位点过滤, 计算过滤后位点的甲基化水平.

差异分析采用limma包中的an empirical Bayes moderated t test对每一甲基化位点探针进行检验, 同时计算经过多重假设检验校正后得到的Adjust Pval值, 筛选差异位点的标准同时满足: (i) Adjust Pval $\leq$ 0.05, 如果Adjust Pval $\geq$ 0.05, 则参考校正之前的P val, 该数值需要 $\leq$ 0.05; (ii) case vs. control Beta-Difference不小于0.2. 即|Beta-Difference| $\geq$ 0.2. 对得到的差异甲基化位点进行统计分析.

根据Illumina官方提供的注释, 得到每个位点对应的基因, 在GO Pathway注释数据库中调取这些基因的注释信息, 并进行功能分析.

(5) 焦磷酸测序. 利用焦磷酸测序技术进行OSBPL5基因的甲基化水平检测. 具体流程依次为: 提取DNA基因组(DNA Epi Tect™ Bisulfite Kit, Qiagen)、亚硫酸盐处理、荧光定量定性、数字PCR定量、焦磷酸测序(Pyro Mark™ PCR Kit, Qiagen).

从5'到3'方向引物序列如下: OSBPL5-F: GGGTGGGAGGGTTGTAAG (Biot); OSBPL5-R: CTCCAAAACCTCTACCAACATC. 测序反应在PyroMark Gold Q96完成(引物: OSBPL5-S GGGTTTTGTGAGGTTTGA).

(6) 数字PCR. 对每一个反应, 1 μ L亚硫酸氢钠处理DNA样品, 加入共15 μ L数字PCR系统, 其中包括一对引物和探针标记FAM和VIC. 这些引物和探针序列从5'到3'方向引物序列如下: Forward primer: GGATTTGGGATTTTGTGTTTAGAGTT; Reverse pri-

mer: CAAAACCTCTACCAACATCCTCCTA; Probe (FAM): TTAGGGTTGGGTCGGGTT; Probe (VIC): TTAGGGTTGGGTTGGGTT. 在芯片上加载上述混合物(QuantStudio3D Digital PCR 20K Chip Kit V2, Thermo Fisher, 美国)进行PCR扩增(扩增程序: 96°C 10 min; 50°C 2 min 98°C 30 s 40周期; 50°C 2 min)使用ProFlex™ PCR仪(Thermo Fisher). 反应结束后扫描芯片, 通过Quantstudio 3D数字PCR系统在线分析(<http://china.apps.thermofisher.com/quantstudio3d/>).

(7) 伦理. 本研究按照国际准则进行, 通过北京儿童医院伦理委员会审查, 并征得患者及其家长的书面同意.

3 结果

3.1 Illumina 450K Infinium Methylation Bead-Chip实验结果分析

(1) 甲基化差异分析. 实验组和对照组样品间探针甲基化水平相关性分析显示大多数位点甲基化水平在SRS患者组和对照组中相关性很强, 实验数据可信度高, Pearson's correlation $P=0.9982$ (图1).

通过聚类, 可以区分实验组和对照组, 这也提示了实验组和对照组中的确存在甲基化水平显著差异的基因, 可能导致疾病形成(图2).

甲基化位点探针筛选差异位点需同时满足如下标准: (i) Adjust P val $\leq$ 0.05, 如果Adjust P val $\geq$ 0.05, 则参考校正之前的P val, 该数值需要 $\leq$ 0.05; (ii) case vs. control Beta-Difference不小于0.2. 即|Beta-Difference| $\geq$ 0.2. 在484821个探针位点中筛选出116个符合上述要求的差异性甲基化位点, 分别位于1~22号不同的染色体上, 其中有9个差异性甲基化位点位于11号染色体上. 这116个差异性甲基化位点共对应99个基因. 其中55个超甲基化、41个低甲基化、3个既有超甲基化位点又有低甲基化位点的基因.

(2) 基因功能分析. 通过GO Pathway注释基因功能分析, 发现6个有可能与SRS致病有关. 这6个基因在GO pathway功能分析中参与的调控功能有: TGF β 3, 调控面部形态、调控 I / II 型转化生长因子 β 受体结合、调控生长因子刺激的细胞应答、以及调控细胞生长; GAP43, 对生长规律及生长锥膜的调控; HSF1, 多细胞生物生长的正向调节; NOTCH4, 对分支结构的形态发

图1 实验组和对照组样品间探针甲基化水平相关性分析 (网络版彩图)

横坐标为甲基化位点在SRS患者组中的甲基化水平平均值, 纵坐标为甲基化位点在对照组中的甲基化水平平均值

生、内皮细胞形态发生的调控; *MYH14*, 对生长锥的调控; *OSBPL5*, 调控高尔基体向质膜运输、脂质转运、胆固醇转运、代谢过程、内质网膜、胞浆、膜结合。在这些基因中, 位于11p15.4的差异性甲基化位点cg25963939所对应的基因*OSBPL5*与胚胎发育、脂类代谢及转运有关, 并且位于传统的差异性甲基化区域, 故可能与SRS致病性有关。本课题组对该基因进行重点研究, 并进一步做了实验验证。

(3) 印记基因*OSBPL5* cg25963939位点分析。*OSBPL5* (oxysterol binding protein-like 5)位于染色体11p15.4, 共78237 bp (3108346~3186582)。已确定为印记基因, 正常人群母源表达^[14,15]。本研究显示, 该基因实验组cg25963939位点低甲基化, 与正常对照组有显著的甲基化差异($P=0.023$, β 值-0.243)。且该基因位于11p14 5' UTR区, 故极有可能致病。表2为*OSBPL5*最明显的甲基化差异探针显示, 实验组中低甲基化的比例是4/7。而且在MLPA阴性的C3-C7这5例中, 低甲基化的比例是4/5。

*IGF2/H19*是公认的11p15 *ICR1*低甲基化基因。*IGF-2*位于chr11p15.5, 共12000 bp: 2150342~2162341。*H19*位于chr11p15.5, 共2660 bp: 2016406~2019065。本

研究中亦有多探针数据显示这2个位点有甲基化差异。选取*IGF2*, *H19*, *OSBPL5*各2个最具代表性的差异性甲基化位点, 以点线图表示实验组与对照组的甲基化差异。从表3及点线图(图3)中可看出, 这6个位点的 $P<0.05$, 但只有*OSBPL5*的cg25963939位点 β 绝对值 >0.2 , 故此可以看出, *OSBPL5*的cg25963939位点甲基化差异更明显。

(4) 用焦磷酸测序及数字PCR定量方法验证*OSBPL5*基因cg25963939位点甲基化差异。进一步用焦磷酸测序及数字PCR定量方法对该位点进行验证。对标本进行亚硫酸氢盐转化、设计双荧光标记Taqman探针, 利用不同荧光检测甲基化位点及非甲基化位点, 利用荧光定量检测探针工作效率、利用数字PCR进行准确定量、焦磷酸测序。结果显示, 全基因组甲基化芯片检测与经典法焦磷酸测序、新技术数字PCR 3种方法总体趋势一致性较好, 故结果可信。焦磷酸测序显示, 该位点CpG百分比实验组与正常对照组有显著的差异, $P=0.036$ 。数字PCR对该位点的验证结果显示, 实验组甲基化均值为48.86, 对照组为54.8, 实验组甲基化低于对照组, 但因样本量较小, 致使统计学无显著性差异, $P=0.475$ 。

MLPA阴性的C3-C7这5例与对照组比较, 结果亦与上述相同, 即焦磷酸测序显示该位点CpG百分比实验组与正常对照组有显著的差异, $P=0.014$ 。数字PCR对该位点的验证结果显示, 实验组甲基化均值为41.6, 对照组为54.8, 实验组甲基化低于对照组, 但因样本量较小, 致使统计学无显著性差异, $P=0.137$ (表4)。

4 讨论

SRS是表观遗传疾病的典型代表。近年来, 随着高通量DNA甲基化检测技术的出现, DNA甲基化的生物信息学研究得到了很大的发展。已知SRS文献最多的报道是染色体11p15 *IGF2-H19*基因簇*ICR1*低甲基化^[2,7,16-18]。*IGF-2*位于染色体11p15.5, 共12000 bp。本研究多个探针数据显示, *IGF-2/H19*有甲基化差异位点, 证实了本组病人与文献报道的致病基因一致。与传统方法MS-MLPA检测相一致。同时本研究发现, 相较*IGF-2/H19*甲基化差异位点, *OSBPL5*在本研究中的甲基化差异更为显著。本研究检测到的116个差异性甲基化位点分别位于1~22号不同的染色体上, 其中有

图 2 实验组-对照组甲基化差异位点聚类热图
左侧为对照组样本(5例), 右侧为SRS患者样本(7例), 对照组和SRS患者样本均有相应特异的低甲基化位点

表 2 *OSBPL5*最明显的甲基化差异探针

<i>OSBPL5</i> ID	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	Mean C	<i>P</i> value	β difference
cg25963939	0.919	0.884	0.513	0.895	0.458	0.495	0.524	0.670		
	N1	N2	N3	N4	N5			Mean N	0.023	-0.243
	0.925	0.913	0.905	0.897	0.923			0.913

图 3 实验组与对照组最具代表性的差异性甲基化位点比较

从图上看, 不仅*OSBPL5*, 而*IGF2*, *H9*都有差异. 因此, 都不该忽略. 但是本研究仅分析*OSBPL5*

9个差异性甲基化位点位于11号染色体上, 通过GO pathway功能分析, 只有位于11p15.4的甲基化位点cg25963939差异性最显著, 其所对应的印记基因*OSBPL5*与胚胎发育有关. *OSBPL5*位于染色体11p15-4, 共78237 bp, 本研究显示*OSBPL5*在5' UTR区域有明显的低甲基化, 且临近11p15.5的*IGF2-H19*基因簇*ICR1*, 故可能与SRS致病性有关.

进一步用经典的焦磷酸测序及数字PCR定量方法对全基因组甲基化芯片检测出的此差异位点进行验证, 3种检测技术均显示实验组较对照组低甲基化, 总体趋势一致性较好. 在MLPA阴性的C3-C7这5例中, 低甲基化的比例是4/5. 其中C3, C5, C6, C7用上述3种检测技术均一致显示*OSBPL5*的cg25963939位点低甲基化. 而C1, C2在之前的研究中已用传统方法MS-MLPA

检测证实了*IGF-2/H19*的甲基化差异. 故进一步提示, 多种检测方法的联合应用有助于提高SRS低甲基化的阳性率.

GO pathway显示, *OSBPL5*与胆固醇、脂类代谢及转运, 以及内质网、高尔基、质膜的转运及完整等相关. 相对于其他SGA, SRS患儿异常瘦小. 既往的研究显示, BMI明显降低, 故考虑可能与*OSBPL5*调控的脂代谢异常相关. Park等人^[19]的体外实验显示, *OSBPL5*对人类多能干细胞印记稳定性起作用. Li等人^[20]对胚胎干细胞印记基因研究显示, *OSBPL5*对组织分化起正向调节作用. Turan等人^[21]在对23例新生儿脐带血甲基化检测中, 发现了与出生体重相关的6个基因, 其中就有*OSBPL5*. Filges等人^[22]在对一位34岁由于胎儿三倍体反复流产(流产18次)的女性及其父母全外显子测

表 3 *IGF2*, *OSBPL5*, *H19* 甲基化位点

	<i>IGF2</i>		<i>OSBPL5</i>		<i>H19</i>	
	cg27263998	cg27331871	cg25963939	cg00500359	cg23476401	cg00237904
C1	0.581	0.135	0.919	0.689	0.555	0.477
C2	0.501	0.142	0.884	0.475	0.527	0.357
C3	0.639	0.169	0.513	0.610	0.527	0.357
C4	0.640	0.303	0.895	0.442	0.663	0.554
C5	0.705	0.229	0.458	0.493	0.706	0.705
C6	0.629	0.075	0.495	0.073	0.563	0.588
C7	0.565	0.097	0.524	0.057	0.640	0.607
N1	0.786	0.226	0.925	0.537	0.799	0.627
N2	0.715	0.198	0.913	0.752	0.762	0.692
N3	0.692	0.205	0.905	0.507	0.625	0.649
N4	0.714	0.263	0.897	0.419	0.750	0.805
N5	0.801	0.287	0.923	0.596	0.677	0.644
Mean_C	0.609	0.164	0.670	0.406	0.597	0.546
Mean_N	0.742	0.236	0.913	0.562	0.723	0.683
<i>P</i> value	0.002	0.073	0.023	0.196	0.008	0.024
β	-0.133	-0.072	-0.243	-0.157	-0.125	-0.137

表 4 不同方法检测 *OSBPL5* 基因甲基化

实验组	性别	年龄(岁)	11p15 MLPA	UPD(7) mat	芯片检测甲 基化程度	CpG 焦磷酸测序 CpG 百分比	CpG 数字 PCR CpG 百分比
C1	男	1.75	(+)	(-)	0.919	79	80
C2	女	2.67	(+)	(-)	0.884	83	54
C3	女	2.92	(-)	(-)	0.513	27	33
C4	男	5.58	(-)	(-)	0.895	80	73
C5	女	3.75	(-)	(-)	0.458	23	32
C6	男	4.83	(-)	(-)	0.495	24	35
C7	男	3.92	(-)	(+)	0.524	29	35
对照组							
N1	女	1.17			0.925	83	56
N2	女	2.50			0.913	84	52
N3	男	3.08			0.905	80	52
N4	男	4.17			0.897	82	55
N5	女	5.67			0.923	79	59
2组比较					$t=-2.969$ $P=0.025$	$t=-2.416$ $P=0.036$	$t=-0.759$ $P=0.475$
C3-C7与N1-N5比较					$t=-4.171$ $P=0.014$	$t=-4.113$ $P=0.014$	$t=-1.654$ $P=0.137$

序发现47个候选基因, 并对其中的8个基因做了Sanger测序验证, 发现OSBPL5与受精前卵母细胞的活性相关。上述这些研究提示, OSBPL5可能引起胚胎发育和脂肪代谢异常, 与SRS一些临床表现相关, 如身材矮小和低BMI, 故有可能引起SRS致病。

本研究还发现需重点关注的其他几个基因, 之前亦未报道过与SRS相关, 分别与胚胎发育及生长调控相关。Young等人^[23]报道TGFβ3与面部畸形相关, 与胚胎细胞形成、增殖、分化等相关, SRS有特异性的面部特征, 故亦需考虑TGFβ3可能与SRS有关。GAP43参与生长调控。NOTCH4与胚胎分支结构及内皮细胞形态发生相关。但总体上述基因均参与生长相关的调控, 而SRS以生长受限为主要表现, 故需考虑上述基因与SRS可能关联。

对于甲基化水平的研究方法很多, 每种方法都有其优缺点, 目前还没有一种检测技术可以覆盖全部

表观遗传改变。甲基化研究方法多, 从一个方面说明了甲基化研究难度大, 也从另一个方面说明这些方法都存在着一定的限制。本研究运用不同的甲基化检测手段, 从经典的MLPA, 全基因组甲基化芯片检测, 以及经典的焦磷酸盐测序、最新的数字PCR定量分析, 检测及验证SRS患者的甲基化差异。进一步证实了本研究结果的可靠性。也进一步提示, 多种检测方法的联合应用, 有助于提高SRS低甲基化的阳性检测。

本研究通过全基因组甲基化芯片检测, 焦磷酸盐测序及数字PCR定量两种方法验证, 发现11p14的印记基因OSBPL5, 极有可能与SRS致病性相关。本研究通过Illumina 450K Infinium高密度微阵列甲基化水平检测, 再次证实SRS最主要的表观遗传甲基化改变最主要定位于11p1区。本研究局限性在于研究例数太少, 只是起到了抛砖引玉的效果, 希望为今后SRS发病机制的研究起到促进作用。

参考文献

- 1 Eggermann T. Russell-Silver syndrome. *Am J Med Genet*, 2010, 154C: 355–364
- 2 Eggermann T, Spengler S, Gogiel M, et al. Epigenetic and genetic diagnosis of Silver-Russell syndrome. *Expert Rev Mol Diagnost*, 2012, 12: 459–471
- 3 Anderson J, Viskochil D, O’Gorman M, et al. Gastrointestinal complications of Russell-Silver syndrome: a pilot study. *Am J Med Genet*, 2002, 113: 15–19
- 4 Carrera I A, de Zaldívar M S, Martín R, et al. Microdeletions of the 7q32.2 imprinted region are associated with Silver-Russell syndrome features. *Am J Med Genet*, 2016, 170: 743–749
- 5 Azzi S, Rossignol S, Steunou V, et al. Multilocus methylation analysis in a large cohort of 11p15-related foetal growth disorders (Russell Silver and Beckwith Wiedemann syndromes) reveals simultaneous loss of methylation at paternal and maternal imprinted loci. *Hum Mol Genet*, 2009, 18: 4724–4733
- 6 Turner C L S, Mackay D M, Callaway J L A, et al. Methylation analysis of 79 patients with growth restriction reveals novel patterns of methylation change at imprinted loci. *Eur J Hum Genet*, 2010, 18: 648–655
- 7 Begemann M, Spengler S, Kanber D, et al. Silver-Russell patients showing a broad range of ICR1 and ICR2 hypomethylation in different tissues. *Clin Genet*, 2011, 80: 83–88
- 8 Prickett A R, Ishida M, Böhm S, et al. Genome-wide methylation analysis in Silver-Russell syndrome patients. *Hum Genet*, 2015, 134: 317–332
- 9 Azzi S, Steunou V, Tost J, et al. Exhaustive methylation analysis revealed uneven profiles of methylation at IGF2/ICR1/H19 11p15 loci in Russell Silver syndrome. *J Med Genet*, 2015, 52: 53–60
- 10 Kagami M, Mizuno S, Matsubara K, et al. Epimutations of the IG-DMR and the MEG3-DMR at the 14q32.2 imprinted region in two patients with Silver-Russell Syndrome-compatible phenotype. *Eur J Hum Genet*, 2015, 23: 1062–1067
- 11 Eggermann T, Heilsberg A K, Bens S, et al. Additional molecular findings in 11p15-associated imprinting disorders: an urgent need for multi-locus testing. *J Mol Med*, 2014, 92: 769–777
- 12 Docherty L E, Rezwan F I, Poole R L, et al. Genome-wide DNA methylation analysis of patients with imprinting disorders identifies differentially methylated regions associated with novel candidate imprinted genes. *J Med Genet*, 2014, 51: 229–238
- 13 Wu D, Gong C, Zheng H, et al. Clinical characteristics and chromosome 11p15 imprinting analysis of Silver-Russell syndrome—a Chinese

- experience. *J Pediatr Endocr Metab*, 2014, 27: 1113–1120
- 14 Morison I M, Ramsay J P, Spencer H G. A census of mammalian imprinting. *Trends Genet*, 2005, 21: 457–465
- 15 Higashimoto K, Soejima H, Yatsuki H, et al. Characterization and imprinting status of OBPH1/Obph1 gene: implications for an extended imprinting domain in human and mouse. *Genomics*, 2002, 80: 575–584
- 16 Bartholdi D, Krajewska-Walasek M, Ounap K, et al. Epigenetic mutations of the imprinted IGF2-H19 domain in Silver-Russell syndrome (SRS): results from a large cohort of patients with SRS and SRS-like phenotypes. *J Med Genet*, 2009, 46: 192–197
- 17 Eggermann T, Schönherr N, Eggermann K, et al. Use of multiplex ligation-dependent probe amplification increases the detection rate for 11p15 epigenetic alterations in Silver-Russell syndrome. *Clin Genet*, 2008, 73: 79–84
- 18 Eggermann T, Begemann M, Binder G, et al. Silver-Russell syndrome: genetic basis and molecular genetic testing. *Orphanet J Rare Dis*, 2010, 5: 19
- 19 Park S W, Kim J, Park J L, et al. Variable allelic expression of imprinted genes in human pluripotent stem cells during differentiation into specialized cell types *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 446: 493–498
- 20 Li S S L, Yu S L, Singh S. Epigenetic states and expression of imprinted genes in human embryonic stem cells. *World J Stem Cells*, 2010, 2: 97–102
- 21 Turan N, Ghalwash M F, Katari S, et al. DNA methylation differences at growth related genes correlate with birth weight: a molecular signature linked to developmental origins of adult disease? *BMC Med Genomics*, 2012, 5: 10
- 22 Filges I, Manokhina I, Peñaherrera M S, et al. Recurrent triploidy due to a failure to complete maternal meiosis II: whole-exome sequencing reveals candidate variants. *MHR-Basic Sci Reprod Med*, 2015, 21: 339–346
- 23 Young D L, Schneider R A, Hu D, et al. Genetic and teratogenic approaches to craniofacial development. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2000, 11: 304–317