

Aus dem Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Analyse der DNA-Methylierung des *GNAS*-Gens bei
diskordanten, monozygoten Zwillingen
mit kongenitaler Hypothyreose**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Vera Thormeyer

aus Berlin

Datum der Promotion: 01.03.2019

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kongenitale Hypothyreose	1
1.2	diskordante monozygote Zwillinge	7
1.3	Konzepte für die Erklärung diskordanter monozygoter Zwillinge	7
1.4	GNAS.....	12
1.5	Zielsetzung der Arbeit	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.2	Untersuchte Proben	19
2.3	Erklärung und Durchführung der angewandten Methoden	20
2.4	Richtlinien	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Etablierung der Methode.....	31
3.2	Methylierungspattern bei Schilddrüsengesunden	33
3.3	GNAS1A1 bei diskordanten monozygoten Zwillingen	35
3.4	GNAS1A2 bei diskordanten monozygoten Zwillingen.....	37
4	Diskussion	40
4.1	Diskussion der gewählten Region.....	40
4.2	Diskussion der Methoden	41
4.3	Diskussion der Ergebnisse	44
4.4	Weiteres Vorgehen	50
4.5	Alternative Erklärungsansätze	52
4.6	Zusammenfassung	54
5	Literaturverzeichnis	55
6	Eidesstaatliche Versicherung	62
7	Curriculum vitae	63
8	Danksagung	65

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: vereinfachtes Schema der Funktion eines Schilddrüsenfollikels	2
Abb. 1.2: Schilddrüsendysgenesien nach Grüters und Krude (2011)	4
Abb. 1.3: Schritte der Schilddrüsenentwicklung in Mausembryos in 3D-Rekonstruktion nach Alt et al. (2006)	5
Abb. 1.4: Ausbildung der DNA-Methylierung modifiziert nach Reik et al. (2001)	10
Abb. 1.5: Schema des imprinteten Gnas-Lokus und seiner Proteine nach Plagge et al. (2008)	13
Abb. 2.1: Schema der Bisulfitkonvertierung modifiziert nach Clark et al. (2006)	21
Abb. 2.2: In der Arbeit untersuchte CG-Positionen	27
Abb. 2.3: Prinzip der Pyrosequenzierung nach Centre for Genomic Sciences (The University of Hong Kong, 2015)	28
Abb. 2.4: Beispiel eines Pyrogramms für die Region GNAS1A2	28
Abb. 3.1: Schema des GNAS-Genlokus mit GNAS1A1 und GNAS1A2	30
Abb. 3.2: Ethidiumbromidgel-Foto: PCR Produkt	31
Abb. 3.3: Ethidiumbromidgel-Foto Vergleich 1. (40 Zyklen) und 2. (40+20 Zyklen) PCR	32
Abb. 3.4: GNAS 1A2 Vergleich der Mittelwerte aller CpG-Positionen nach 40 (1. PCR) und nach 40+20 Zyklen (2.PCR)	32
Abb. 3.5: Vergleich GNAS 1A2 DNA-Methylierungspattern nach 40 Zyklen (1.PCR) mit GNAS 1A2 DNA-Methylierungspattern nach 40+20 Zyklen (2.PCR)	33
Abb. 3.6: GNAS1A1 DNA-Methylierungspattern schilddrüsengesunder Kontrollen.....	34
Abb. 3.7: GNAS1A2 DNA-Methylierungspattern schilddrüsengesunder Kontrollen.....	34
Abb. 3.8: GNAS 1A1 Vergleich der CpG Positionen 1-10 von gesunden und kranken Zwillingen sowie schilddrüsengesunden Kontrollen.....	35
Abb. 3.9: Vergleich der erkrankten Zwillinge mit ihrer genetisch identischen Kontrolle an allen CG-Positionen von GNAS1A1 sowie mit den Mittelwerten der schilddrüsengesunden Kontrollen 1-12	36
Abb. 3.10: GNAS 1A2 Vergleich der CpG Positionen 1-10 von gesunden und kranken Zwillingen.....	37
Abb. 3.11: Vergleich der erkrankten Zwillinge mit ihrer genetisch identischen Kontrolle an allen CG-Positionen von GNAS1A2 sowie mit den Mittelwerten der schilddrüsengesunden Kontrollen 1-12	38

Abb. 3.12: Vergleich der Zwillingspaare und gesunden Kontrollen an Position 10 GNAS1A2.....	39
Abb. 4.1: Die untersuchten Genabschnitte GNAS1A1 und GNAS1A2 in ihrer Beziehung zu Exon 1A	44
Abb. 4.2: Gnas-Methylierung in Oozyten, Spermien und Blastozysten von Mäusen aus Kelsey und Feil (2013).....	45
Abb. 4.3: Schema des GNAS-Genlokus nach Kelsey (2010)	48
Abb. 4.4: Veranschaulichung der epigenetischen Komplexität nach Allis und Jenuwein (2016):	53

Abstract

The congenital hypothyroidism is the most common neonatal endocrine disorder with an incidence of 1:4000 – 1:3000 worldwide. The disease is primarily caused by a developmental defect called thyroid dysgenesis (TD). Genetic causes are known in less than 5% of patients with TD. In general monozygotic twins with the disorder have been reported as discordant. Therefore it is suggested that TD does not result from Mendelian inheritance but epigenetic defects. In 2015 a first epigenetic defect, a DNA-methylation defect, was found in the *GNAS* gene in a patient with congenital hypothyroidism. *GNAS* is encoding for the G α -subunit of the G-protein. G-protein linked mechanisms mediate the action of a number of hormones, including TSH (thyroid-stimulating hormone). It is supposed that an epigenetic defect in *GNAS* leads to a dysfunction of the TSH-receptor and therefore to a disrupted thyroid development. Two fragments of the *GNAS* locus were chosen to be analyzed. The first fragment is located in a region that is already known for DNA methylation defects in correlation to TSH resistance. The second fragment is located in the exon 1 promoter region of the *GNAS*-gene. DNA-methylation was analyzed by pyrosequencing of bisulfite treated DNA of discordant monozygotic twins with TD. One of the two fragments showed little DNA-methylation differences between the affected and the healthy twins. Although it is unlikely that this difference could be a cause for TD, further studies are needed to find out whether DNA-methylation defects in *GNAS* are a cause of the disease or other mechanisms are more relevant.

Abstrakt

Die primäre kongenitale Hypothyreose ist die häufigste angeborene endokrine Störung. Sie tritt weltweit mit einer Inzidenz von 1:4000 – 1:3000 auf. Die häufigste Ursache ist ein Entwicklungsdefekt der Schilddrüse, die sogenannte Schilddrüsendysgenese. Genetische Ursachen für diese Erkrankung wurden bei weniger als 5% der Betroffenen gefunden. In der Regel sind von Schilddrüsendysgenese betroffene monozygote Zwillinge hinsichtlich der Erkrankung diskordant. Da dies gegen eine klassische Mendelsche Vererbung spricht, wird angenommen, dass die Schilddrüsendysgenese durch epigenetische Defekte verursacht wird. 2015 wurde erstmals eine kongenitale Hypothyreose mit den zu den epigenetischen Defekten gehörenden DNA-Methylierungsdefekten auf dem *GNAS*-Genlokus in Verbindung gebracht. *GNAS* codiert für die G α -Untereinheit des G-Proteins. G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermitteln die Aktion zahlreicher Hormone, unter anderem die des Thyroidea-stimulierenden Hormons (TSH). Es wird angenommen, dass ein epigenetischer Defekt auf dem *GNAS*-Gen zu einer Fehlfunktion des TSH-Rezeptors und somit zu einer defekten Schilddrüsenentwicklung führt.

Es wurden zwei Fragmente des *GNAS*-Genlokus zur Untersuchung ausgewählt. Das erste Fragment liegt in einer Region, in der bereits DNA-Methylierungen mit TSH-Resistenz in Verbindung gebracht werden konnten. Das zweite Fragment befindet sich in der Exon 1-Promoterregion des *GNAS*-Gens. Die dort lokalisierten DNA-Methylierungen wurden anschließend mittels Pyrosequenzierung bisulfitumgewandelter DNA von diskordanten monozygoten Zwillingen mit Schilddrüsendysgenese analysiert. Eines der beiden Fragmente zeigte geringe DNA-Methylierungsdifferenzen zwischen den erkrankten und gesunden Zwillingen. Es ist unwahrscheinlich, dass diese Differenzen eine Ursache für die Erkrankung darstellen. Es werden jedoch weitere Studien benötigt, um herauszufinden, ob Methylierungsänderungen in *GNAS* eine Ursache für die Erkrankung sein könnten oder eher andere Mechanismen Einfluss darauf üben.

1 Einleitung

1.1 Kongenitale Hypothyreose

Die primäre kongenitale Hypothyreose ist die häufigste angeborene endokrine Störung. Sie tritt weltweit mit einer Inzidenz von 1:4000 – 1:3000 auf. Eine Ausnahme bilden jedoch zwei Bevölkerungsgruppen der USA. Dazu gehören hispanische Neugeborene, bei denen die Erkrankung mit einer erhöhten Inzidenz von 1:2000 auftritt und solche afro-amerikanischen Ursprungs mit einer deutlich geringeren Inzidenz von 1:10000 (Grüters und Krude, 2011; Romanet et al., 2015). Mädchen sind zwei- bis viermal häufiger betroffen als Jungen (Lorey und Cunningham 1992; Devos et al., 1999).

Im Allgemeinen unterscheidet man die primäre Hypothyreose, bei der die Schilddrüse einen Defekt aufweist, von der zentralen Hypothyreose, die durch Störungen der Hypophyse (sekundär) oder des Hypothalamus (tertiär) verursacht wird und sehr viel seltener als die primäre Form mit einer Inzidenz von 1:50000 auftritt (Grüters et al., 2003). Bei beiden Formen kann der Körper nicht adäquat mit Schilddrüsenhormon versorgt werden. Die primäre Hypothyreose weist im Blut erhöhte Werte des Thyroidea-stimulierenden Hormons (TSH) auf. Bei der zentralen Hypothyreose sind die TSH-Werte erniedrigt.

1.1.1 Klinik

Schilddrüsenhormone spielen eine essentielle Rolle in der Entwicklung des Nervensystems von Neugeborenen und Kindern. So hat eine unbehandelte kongenitale Hypothyreose neurologische Defizite zur Folge, zum Beispiel mentale Retardierung oder motorische Entwicklungsstörungen (Leger et al., 2014).

Durch die rechtzeitige und lebenslange Substitution der Schilddrüsenhormone in Form von L-Thyroxin können diese und andere Folgen verhindert werden.

Neugeborenen Screenings zum Erkennen der kongenitalen Hypothyreose, die bei Geburt nur sehr unspezifische klinische Zeichen aufweist, werden seit etwa dreißig Jahren in den meisten Industrieländern durchgeführt. Sie sorgen für eine schnelle Erkennung und Möglichkeit zur Behandlung der Erkrankung. Bei mehr als 90 Prozent der Patienten, die eine rechtzeitige und ausreichend hohe Substitutionstherapie erhielten, konnte eine normale geistige Entwicklung in Langzeitstudien beobachtet werden. Es konnten keine IQ-Unterschiede zwischen den Patienten und ihren gesunden Geschwistern gefunden werden (Aleksander et al., 2018; Grüters et al., 2002).

1.1.2 Defekte der Schilddrüsenhormonbiosynthese

Das im Hypothalamus gebildete Thyreotropin-releasing Hormon (TRH) stimuliert in der Adenohypophyse die Freisetzung des TSH, das wiederum über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (TSHR) die Synthese und Freisetzung der Schilddrüsenhormone Tetraiodthyronin (T₄, L-Thyroxin) und Triiodthyronin (T₃) in den Follikeln der Schilddrüse steigert. Die Schilddrüsenhormone werden aus der Aminosäure Tyrosin synthetisiert und enthalten drei beziehungsweise vier Iod-Atome. Der Ablauf ihrer Synthese wird in Abb. 1.1 veranschaulicht.

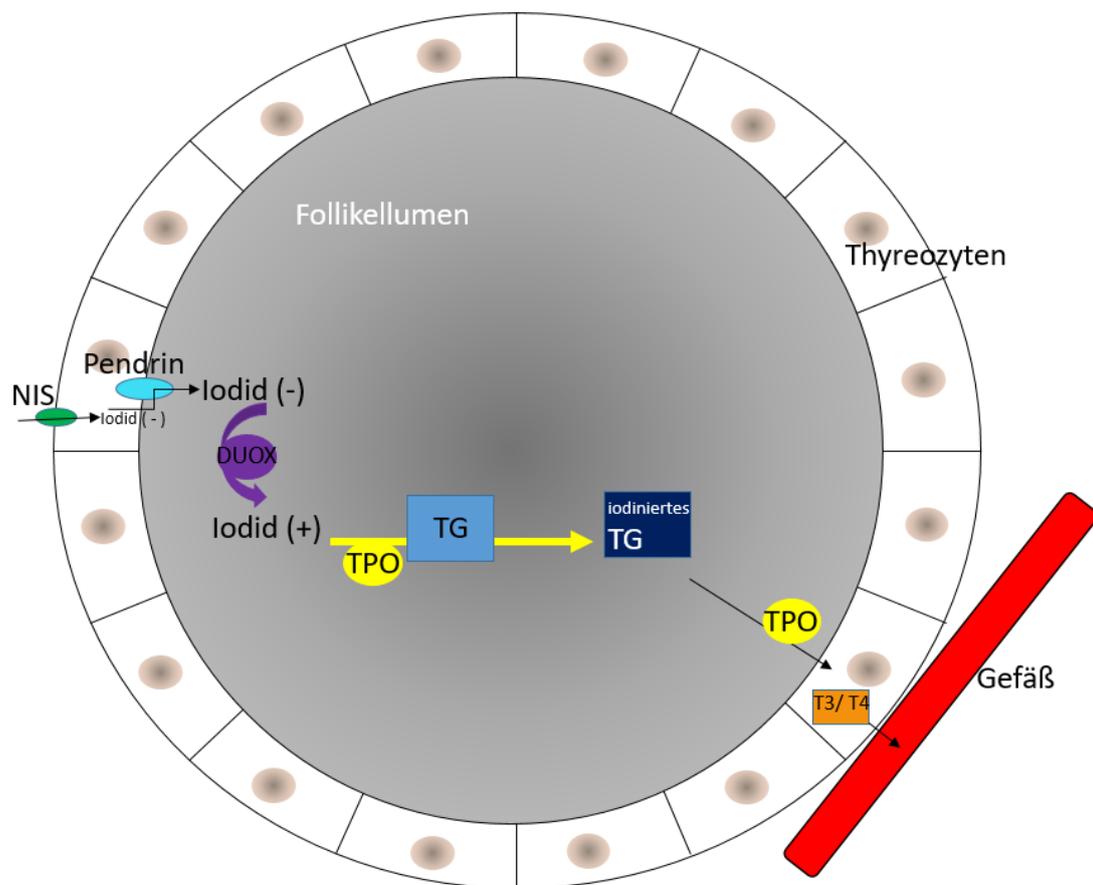


Abb. 1.1: vereinfachtes Schema der Funktion eines Schilddrüsenfollikels

Thyreoglobulin (TG, hellblau) wird in den Thyreozyten synthetisiert und intrazellulär gespeichert. Zur Schilddrüsenhormonsynthese wird es in das Follikellumen sezerniert. Über den Na⁺/I⁻-Symporter (NIS, grün) wird Iodid in den Thyreozyten angereichert und gelangt über den Anionentransporter Pendrin (türkis) ebenfalls in das Follikellumen, wo es katalysiert durch das Dualoxidase 1 und 2-enzymatische System (DUOX, lila) mit Hilfe von H₂O₂ zunächst oxidiert und dann, katalysiert durch die Thyreoperoxidase (TPO, gelb), zur Iodierung von Tyrosylresten des TG verwendet wird. Durch Kopplung dieser Produkte entstehen, ebenfalls durch die TPO katalysiert, T₃ und T₄ (orange). Nach proteolytischer Spaltung vom TG können sie ins Blut freigesetzt werden (Grüters und Krude, 2011).

Bei 15% – 20% der primären angeborenen Schilddrüsenunterfunktionen treten Defekte in der Schilddrüsenhormonbiosynthese deutlich seltener auf als die Schilddrüsendysgenese (Kühnen et al., 2013).

Ursächlich für Schilddrüsenhormonbiosynthesedefekte sind überwiegend Enzymdefekte, die dazu führen, dass eine adäquate Schilddrüsenhormonbildung in der angelegten Schilddrüse nicht oder nur eingeschränkt möglich ist. Hervorgerufen werden sie vor allem durch rezessive Mutationen in den Genen *SLC5A5* (NIS-Gen), *TPO*, *DUOX2* (Dualoxidase-2-Gen), *SLC26A4* (Pendrin-Gen), und *TG* (Thyreoglobulin-Gen) (Kühnen et al., 2013; Leger et al., 2014).

Patienten mit solchen Defekten weisen eine normal angelegte bis vergrößerte Schilddrüse auf, erhöhte TSH-Werte und niedrige bis nicht nachweisbare T4-Werte im Serum. Durch einige Besonderheiten lassen sich die Enzymdefekte voneinander abgrenzen. Bei einem Aktivitätsverlust der TPO oder Funktionsverlust von TG haben die Betroffenen eine Schilddrüsenunterfunktion mit Struma. Bei einer mit angeborener Schilddrüsenunterfunktion einhergehenden Gehörverlust sollte von *SLC26A4*-Mutationen ausgegangen werden, da Pendrin nicht nur im Schilddrüsenfollikel, sondern auch im Innenohr wichtige Funktionen übernimmt. Defekte im DUOX, dem Enzymsystem, das die H₂O₂-Synthese für die Iod-Oxygenierung katalysiert (s.

Abb. 1.1), rufen oft nur schwach erhöhte TSH-Werte hervor, möglicherweise, weil die restlichen Enzyme des Systems den Defekt abfangen können (Grüters und Krude, 2011).

1.1.3 Schilddrüsendysgenese

Eine Anlagestörung der Schilddrüse ist mit 80% – 85% der Fälle der häufigste Grund für die primäre Form einer angeborenen Schilddrüsenunterfunktion (Kühnen et al., 2013).

Patienten mit Schilddrüsendysgenese weisen entweder ein komplettes Fehlen der Schilddrüse auf, die sogenannte Agenesie, eine Schilddrüsenektomie, bei der eine Lageanomalie der Schilddrüse auftritt, oder eine Hypoplasie des Schilddrüsenorgans (s. Abb. 1.2)

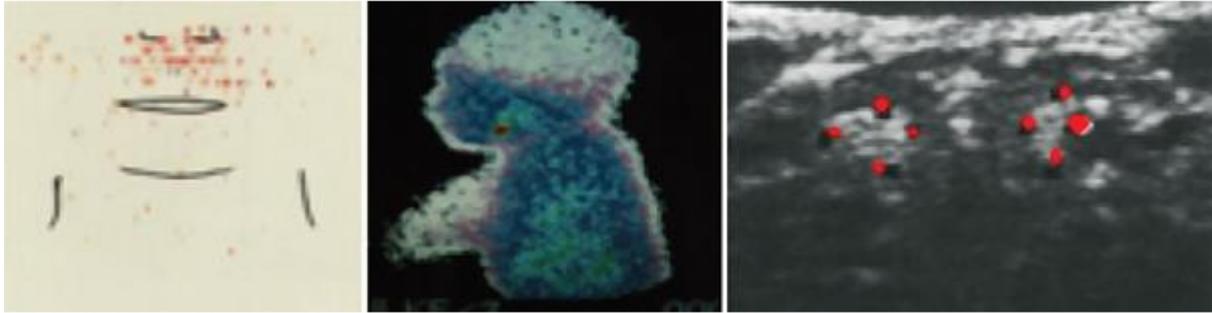


Abb. 1.2: Schilddrüsendysgenesien nach Grüters und Krude (2011)

Die drei unterschiedlichen Formen der Schilddrüsendysgenese: 1) Agenesie, Szintigraphiebild 2) Ektopie, Szintigraphiebild 3) Hypoplasie, Ultraschallbild

Die Schilddrüse entwickelt sich aus zwei unterschiedlichen embryonalen Geweben.

Die Schilddrüsenhormone produzierenden Follikelzellen entstehen aus dem Endoderm der Mundhöhle (s. Abb. 1.3), während sich die Calcitonin bildenden C-Zellen aus dem ultimobranchialen Körper bilden, der ursprünglich aus der Neuralleiste entsteht. Nachdem die Wanderung der Gewebe abgeschlossen ist, reifen die Follikelzellen der Schilddrüse weiter.

Die Calcitoninwerte und die Anlage der C-Zellen bei Patienten mit Schilddrüsendysgenese bleiben normal. Mit Hilfe von natürlich vorkommenden und Knock-out-Mausmodellen konnten Gene, die für die Schilddrüsenentwicklung und Follikelreifung wichtig sind, gefunden werden:

- *Pax 8* (Mansouri et al., 1998)
- *Nkx 2-1* (Kimura et al., 1996)
- *Foxe1* (De Felice et al., 1998)
- *Tshr* (Stein et al., 1994)

Zu welchem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung diese Gene und die funktionellen Gene des TSH-Rezeptors, der Thyreperoxidase (TPO) sowie des Thyreoglobulins (TG) im Mausmodell exprimiert werden, wird in Abb. 1.3 veranschaulicht.

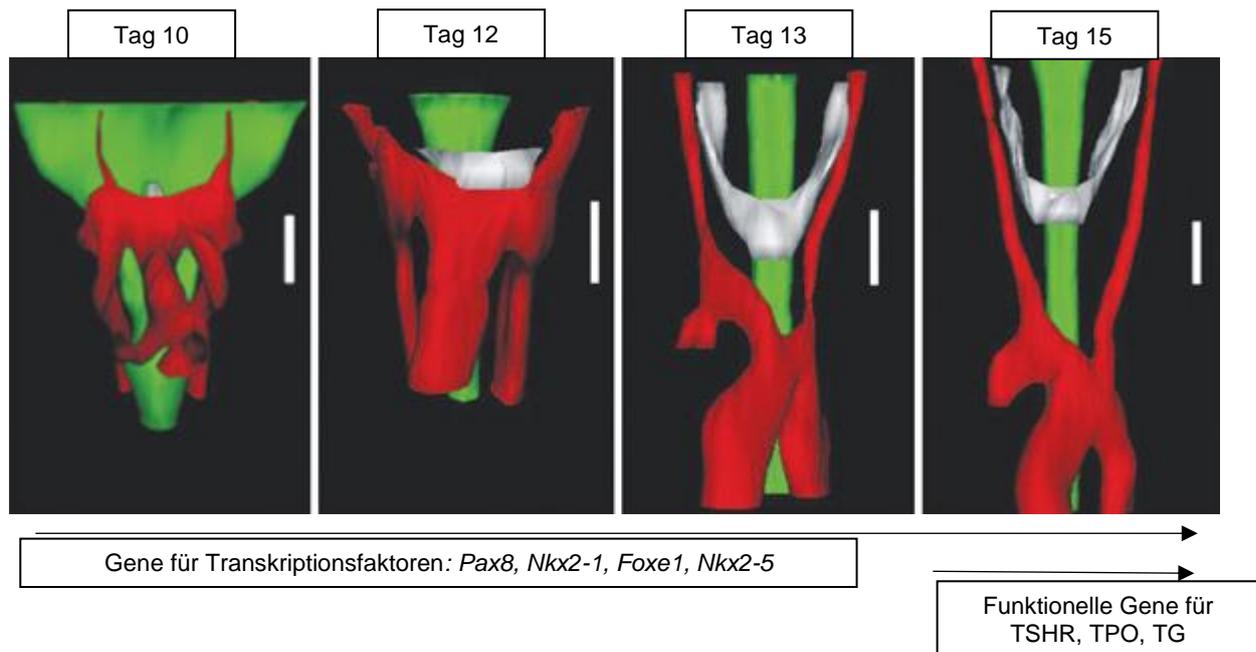


Abb. 1.3: Schritte der Schilddrüsenentwicklung in Mausembryos in 3D-Rekonstruktion nach Alt et al. (2006)

Aus dem endodermalen Pharynx (grün) entwickelt sich an Tag 10 der Mausentwicklung das Schilddrüsengewebe (grau). Es bleibt mit den rot abgebildeten Gefäßen in Kontakt, bis der Aortenbogen in späteren Stadien nach kaudal ins Mediastinum wandert. Die Schilddrüse wandert zurück nach kranial um dort an Tag 15, dem die Woche 12 in der menschlichen Embryonalentwicklung entspricht, die seitlichen Schilddrüsenlappen auszubilden. Während dieser unterschiedlichen Schritte werden kontinuierlich die für Transkriptionsfaktoren kodierenden Gene exprimiert. Das TSHR-Gen und andere funktionelle Gene, die für die Schilddrüsenhormonbiosynthese eine Rolle spielen, werden ausschließlich in späten Stadien der embryonalen Entwicklung exprimiert.

Nach der Untersuchung der genannten Gene im Mausmodell wurden auch im Menschen Mutationen in diesen vier Genen nachgewiesen, die für eine Schilddrüsendysgenese verantwortlich gemacht werden können:

TSHR (TSH-Rezeptor-Gen), im Jahr 1997 erstmalig beschrieben als compound-heterozygote loss-of-function-Mutation (Biebermann et al., 1997). Da davon ausgegangen wird, dass der TSH-Rezeptor wie im Mausmodell erst in späten Stadien der embryonalen Entwicklung synthetisiert wird (s. Abb. 1.3), weisen Patienten mit einer Mutation im *TSHR* typischerweise eine Hypoplasie (s. Abb. 1.2) und kein komplettes Fehlen der Schilddrüse auf.

TTF1 (Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1-Gen, auch *NKX2-1*), im Jahr 2002 beschrieben als heterozygote loss-of-function-Mutation (Krude et al., 2002). Die Patienten mit einer solchen Mutation leiden zusätzlich zu der kongenitalen Hypothyreose an Lungenerkrankungen und einer neurologischen Störung, der Choreoathetose.

TTF2 (Thyroidaler Transkriptionsfaktor 2-Gen, auch *FOXE1*), im Jahr 1998 erstmalig beschrieben als homozygote missense-Mutation (Clifton-Bligh et al., 1998). Diese Mutation wird mit dem Bamforth-Lazarus Syndrom in Verbindung gebracht (Entwicklungsverzögerung, kongenitale Hypothyreose, Lippenkiefergaumenspalte, krauses Haar und Choanalatresie).

PAX8 (Paired Box Protein 8-Gen), im Jahr 1998 beschrieben als heterozygote loss-of-function-Mutation (Macchia et al., 1998). Patienten mit einer solchen Mutation weisen meist eine isolierte Hypothyreose auf, nur in seltenen Fällen zusätzlich eine Hypo- oder Aplasie der Niere.

Zusätzlich zu den Mutationen in Genen, die eine bekannte Rolle in der Schilddrüsenentwicklung der Maus spielen, konnte eine weitere Genmutation mit der Schilddüsendysgenese in Verbindung gebracht werden:

GLIS-3, beschrieben als eine frameshift-Mutation, die im Rahmen eines Syndroms sowohl zu angeborener Hypothyreose, als auch eines angeborenen Diabetes führen (Senee et al., 2006).

Jedoch konnte nur bei weniger als fünf Prozent aller bekannten Patienten mit Schilddrüsendysgenese eine Mutation in diesen beschriebenen Kandidatengen gefunden werden. Die Erkrankung tritt in der Mehrzahl der Fälle sporadisch und von Jahreszeiten unabhängig auf (Deladoey et al., 2007). Sogar bei monozygoten Zwillingen erkrankt überwiegend nur ein Zwilling an Schilddrüsendysgenese, was gegen eine klassische Mendelsche Vererbung als Ursache der Erkrankung spricht (Carre et al., 2017; Leger et al., 2014).

1.2 diskordante monozygote Zwillinge

Monozygote Zwillinge sind für das Verständnis des Pathomechanismus einer angeborenen Erkrankung besonders interessant, weil sie die Umgebung im Mutterleib und vor allem das gleiche Genom teilen, da sie von derselben befruchteten Eizelle abstammen. Somit ist es möglich, herauszufinden, ob eher genetische oder andere pathologische Konzepte mit dem Krankheitsmechanismus in Verbindung gesetzt werden können.

Mehrere publizierte Fallberichte zeigen, dass die kongenitale Hypothyreose bei monozygoten Zwillingspaaren nur bei einem Zwilling dieser Paare auftreten kann, während der andere gesund ist, die Zwillinge also hinsichtlich der Erkrankung diskordant sind (Azam et al., 2012; Kühnen et al., 2009; Perry et al., 2002; Warkany und Selkirk, 1955).

Nur zwei konkordante Zwillingspaare werden in der Literatur erwähnt, wobei sich der Phänotyp des einen Paares in dem Sinne unterscheidet, dass der eine Zwilling eine permanente kongenitale Hypothyreose mit einer ektopisch gelegenen Schilddrüse kranial des Zungenbeines (Os hyoideum), hingegen der andere Zwilling eine transiente kongenitale Hypothyreose mit einer Hemiagenesie der Schilddrüse aufweist (McLean et al., 1985). Der zweite beschriebene Fall konkordanter Zwillinge mit sehr mild ausgeprägter Schilddrüsenhypoplasie geht mit dem Rubinstein-Taybi Syndrom (RSTS) einher. Dies ist eine genetische Erkrankung, die mit physischer und mentaler Retardierung auftritt. In dem Fallbericht wird die Hypothese aufgestellt, dass die Schilddrüsenunterfunktion als Komponente des RSTS auftreten könnte. Dadurch kann die Ausnahme der konkordant mit kongenitaler Hypothyreose auftretenden Zwillinge erklärt werden (Akin et al., 2011).

1.3 Konzepte für die Erklärung diskordanter monozygoter Zwillinge

Eine klassische Mendelsche Vererbung der Schilddrüsendysgenesie passt nicht mit dem so häufigen Auftreten von diskordanten monozygoten Zwillingen zusammen. Die monozygoten Zwillinge entstehen aus einer Eizelle und weisen dasselbe genetische Material auf. Deshalb würden im Falle einer Mendelschen Vererbung beide Geschwister eine Mutation in einem Gen wie *TSHR* aufweisen, die zu einer Schilddrüsendysgenesie führen kann. In einem solchen Fall wären jedoch beide Zwillinge erkrankt, was bei der Erkrankung in der Regel nicht der Fall ist. Der Großteil der aufgetretenen Fälle tritt außerdem sporadisch und jahreszeitenunabhängig auf. Dies spricht auch dafür, dass andere Konzepte zur pathophysiologischen Erklärung dieser Erkrankung herangezogen werden müssen.

Es gibt sowohl genetische als auch epigenetische (s. 1.3.1) Mechanismen und ein Zusammenspiel der beiden. Diese Mechanismen können als Begründung für unterschiedliche Phänotypen bei eineiigen Zwillingen herangezogen werden (Silva et al., 2011).

Zu den genetischen Ursachen gehören unter anderem Chromosomenaberrationen, die über zwei verschiedene Wege zu einem unterschiedlich ausgeprägten Phänotyp monozygoter Zwillinge führen können. Entweder tritt ein mitotischer Fehler bereits vor der Trennung der Zygote auf und wird anschließend unterschiedlich auf die beiden sich entwickelnden Zelllinien verteilt oder der Fehler tritt erst nach der Teilung der Zygote und somit nur bei einem Zwilling auf. Solche Anomalien bei eineiigen Zwillingen mit unterschiedlichen Phänotypen werden beispielsweise bei Auftreten des Turner-Syndroms oder der Trisomie 21 beschrieben (Nieuwint et al., 1999).

Berichte über das Auftreten postzygotischer, chromosomaler Mutationen als Ursache für die Diskordanz sind ebenfalls in der Literatur zu finden. So unter anderem bei Oro-faziodigitalem Syndrom (Shotelersuk et al., 1999) oder Williams-Beuren-Syndrom (Castorina et al., 1997).

Diese genetischen Beispiele treten allerdings extrem selten auf und würden nur als Ausnahmen bei eineiigen Zwillingen mit CH zu finden sein. Da die Diskordanz bei monozygoten Zwillingen mit Dysgenese aber die Regel ist, spricht dies gegen einen solchen Mechanismus.

1.3.1 Epigenetik

Die Epigenetik ist das Studium der Genfunktionsänderungen, die keine Veränderungen der DNA Sequenz beinhalten (Wu und Morris, 2001).

Mechanismen, die einen Einfluss auf die Genexpression haben, die nicht auf der Änderung der DNA Sequenz beruht, können mit DNA-Methylierungen, Histonmodifizierungen (Acetylierung / Methylierung) zusammen mit einer Veränderung der Chromatinstruktur und regulatorischen RNAs in Verbindung gesetzt werden (Holliday, 2006). Histonacetylierung und DNA-Hypomethylierung sind hauptsächlich mit einer aktiven Genexpression assoziiert, während eine Histon-Deacetylierung und DNA-Methylierung zusammen mit einer Genrepression auftreten.

1.3.2 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung ist eine der am besten untersuchten epigenetische Modifikationen. Sie entsteht, indem Methylgruppen durch Methyltransferasen katalysiert an die DNA-Basen angehängt werden. Typischerweise werden die Methylgruppen an das fünfte Kohlenstoffatom des Cytosinrings eines Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Dinukleotids (CpG) angehängt (Bird, 1980). Diese Dinukleotide können verstreut in der DNA sowie gehäuft als so genannte CpG-Inseln vorliegen. Sie werden laut Gardiner-Garden und Frommer (1987) definiert als ein Sequenzbereich von mindestens 200 Basenpaaren, in dem ein CpG-Gehalt von mindestens 60% vorliegt. Die Inseln liegen meist in den regulationsrelevanten Bereichen von Genen. Methylierte CpG-Inseln in diesen Bereichen werden mit einer Genrepression und unmethylierte mit einer normalen Genexpression in Verbindung gesetzt (Razin und Riggs, 1980). DNA-Methylierungsdefekte als epigenetische Modifikation wurden bereits als Ursache für Organmalformationen beschrieben, so zum Beispiel bei diskordanten Zwillingen mit Kaudaduplikation (Oates et al., 2006).

1.3.2.1 Ausbildung der DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierungsmuster bei Säugetieren entstehen in zwei Entwicklungsperioden: der Keimzellreifung und der Embryonalentwicklung. Der Grundmechanismus in beiden Perioden ist eine aktive oder passive Demethylierung und eine zu einem späteren Zeitpunkt statt findende Remethylierung (Lister et al., 2009; Mayer et al., 2000; Reik et al., 2001). Veranschaulicht und beschrieben werden die Prozesse in Abb. 1.4 basierend auf der Keimzellreifung der Maus.

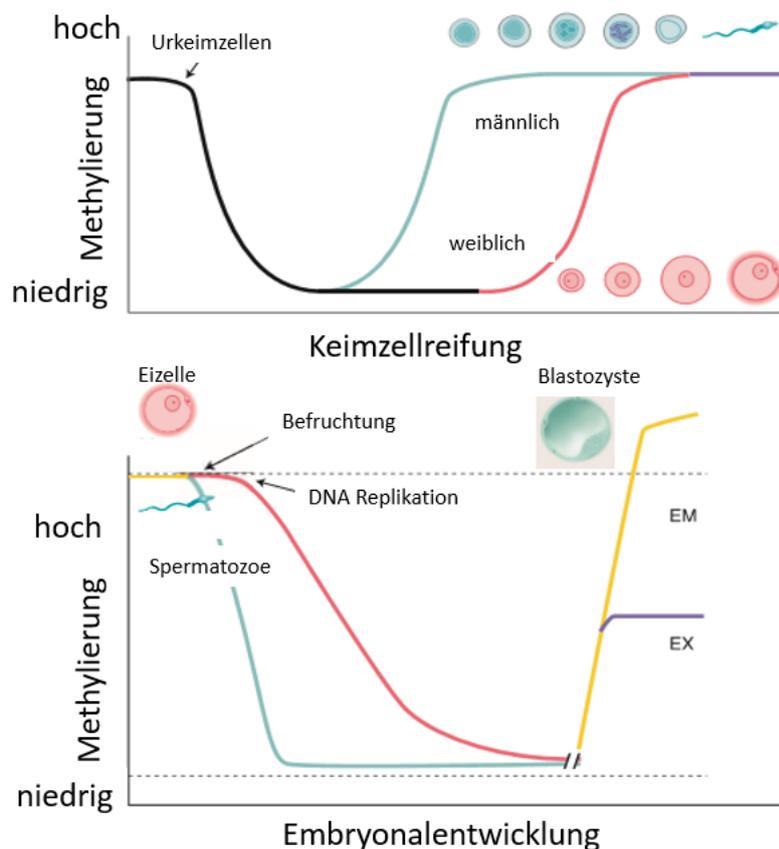


Abb. 1.4: Ausbildung der DNA-Methylierung modifiziert nach Reik et al. (2001)

Bei der Keimzellreifung (obere Abbildung) der Maus werden die Zellen früh in der Entwicklung demethyliert. Die de-novo-Methylierung findet in Spermien (blau) bereits vor der Geburt der Mausembryonen statt, bei den weiblichen Linien erst in wachsenden Oozyten vor der Ovulation. In der unteren Abbildung ist veranschaulicht, dass das paternale Genom (blau) bereits aktiv direkt nach der Befruchtung, das maternale (rot) erst gleichzeitig mit DNA-Replikation passiv demethyliert wird. Beide werden zur Zeit der Implantation remethyliert zu embryonalen (EM) und extraembryonalen Zelllinien (EX). Die gestrichelten Linien stehen für Imprinting-Gene, die entweder nicht de- oder nicht remethyliert werden.

1.3.2.2 „Skewed“ X-Inaktivierung und Imprinting

Zwei bekannte epigenetische Phänomene, die zu einer Diskordanz von monozygoten Zwillingen führen können, sind die skewed X-Inaktivierung und das Imprinting.

Bei der „skewed“ X-Inaktivierung wird ein X-Chromosom in allen Zellen durch epigenetische Prozesse wie beispielsweise DNA-Methylierung stillgelegt.

Dadurch können Krankheiten durch X-Chromosom-gebundene, heterozygote Mutationen auftreten. Diese könnten sonst nicht manifestieren, da das gesunde, aktive X-Chromosom den Defekt kompensieren würde.

Krankheiten, die durch diese „skewed“ X-Inaktivierung bei weiblichen eineiigen Zwillingen diskordant auftreten, sind unter anderem das fragile X-Syndrom (Kruyer et al., 1994), Farbenblindheit (Jorgensen et al., 1992), Muskeldystrophie Duchenne (Zneimer et al., 1993), Haemophilie B (Tiberio, 1994) sowie die Hunter- und Fabry-Krankheit (Tiberio, 1994).

Da aber sowohl weibliche als auch männliche Zwillinge diskordant mit Schilddrüsendysgenese auftreten (s. Tabelle 2.3), sollte ein anderes Konzept zur Erklärung der Erkrankung herangezogen werden.

Imprinting beschreibt ein epigenetisches Phänomen, bei dem Gene an den beiden paternalen Allelen unterschiedliche DNA-Methylierungen oder Histonmodifikationen aufweisen. So kann beispielweise für ein bestimmtes Gen das paternale Allel durch eine DNA-Methylierung inaktiviert sein, während das maternale Allel keine Methylierung an dieser Stelle aufweist und somit aktiv ist (Ferguson-Smith, 2011).

Die weiblichen und männlichen Keimzellen weisen an mehreren Stellen des Genoms unterschiedliche Methylierungen auf, von denen nur ein kleiner Anteil an die Nachkommen weitergegeben wird. Diese unterschiedlich methylierten Bereiche werden DMRs („differentially methylated regions“) oder ICRs („Imprinting control regions“) genannt. Sie sind verantwortlich für die Expression von nur einem Allel in den Imprinting-Genen. Eine DMR kann die Kontrollregion für mehrere Gentranskripte sein (Kelsey und Feil, 2013).

Auch Imprinting-Defekte werden in der Literatur als eine mögliche Ursache für die Diskordanz von monozygoten Zwillingen beschrieben. So beispielsweise beim Beckwith-Wiedemann Syndrom. Hier konnten Imprinting-Defekte im KCNQ1OT1-Gen auf Chromosom 11p15 bei zehn betroffenen Zwillingen nachgewiesen werden. Ihre jeweiligen gesunden Geschwister wiesen den Defekt nicht auf (Weksberg et al., 2002).

Die Diskordanz bei monozygoten Zwillingen mit Schilddrüsendysgenese und das sporadische Erscheinen der Erkrankung könnte ebenfalls durch DNA-Methylierungsdefekte in Imprinting-Genen verursacht sein.

1.4 GNAS

Romanet et al. haben (2015) den ersten und bisher einzigen Fall veröffentlicht, der den Zusammenhang zwischen DNA-Methylierungsdefekten in einem Imprinting-Gen und dem Pathomechanismus der Schilddrüsenunterfunktion herstellt. Berichtet wurde von einer Patientin, bei der nach der Geburt eine primäre Hypothyreose mit einer normal angelegten Schilddrüse festgestellt wurde. Da im Adoleszenzalter aufgrund von erhöhten PTH-Werten und nachweisbarer Parathormonresistenz ein Pseudohypoparathyreodismus diagnostiziert wurde, kam man auf die Idee, nach Mutationen im *GNAS*-Lokus zu suchen. *GNAS* ist ein Gen, das für das $G\alpha$ -Protein, eine Untereinheit von Gs-Proteinen, kodiert und dessen Defekte häufig als Ursache für einen Pseudohypoparathyreodismus gefunden werden konnten (Levine et al., 1980; Patten et al., 1990; Weinstein et al., 1990). Es wurden zwar keine Mutationen, stattdessen aber DNA-Methylierungsdefekte in dem genannten Lokus gefunden.

Der humane *GNAS*-Genlocus auf Chromosom 20q13.11 hat einen sehr komplexen Aufbau. Es ist ein Imprinting-Lokus, der hauptsächlich biallele und ebenso rein maternale oder paternale Transkripte exprimiert. Insgesamt beinhaltet er sechs unterschiedliche, sich überlappende Transkripte, wovon eins ein „antisense“-Transkript vom gegenüberliegenden DNA-Strang darstellt. Diese stammen von vier alternativen Promotern und Exons (s. Abb. 1.5).

Die wichtigsten Transkripte des Lokus stellen die beiden dar, die für die G-Protein-Untereinheit $G\alpha$ und für die größere Variante davon, *XL α s*, kodieren. Beide besitzen dreizehn Exons, wobei das Exon 1 von *GNASXL* (für *XL α s* kodierendes Transkript) etwa 35 Kilobasenpaare 5' des ersten Exons des Exon 1 von *GNAS* (für $G\alpha$ kodierendes Transkript) liegt. Die restlichen Exons 2-13 teilen sich die beiden Transkripte.

Den anderen vier Transkripten *NESP55*, *ALEX*, *1A* (auch *A/B*) und *NESPAS* („antisense“) des *GNAS*-Lokus wird eine Funktion in der Imprintingkontrolle oder einer Beeinflussung der $G\alpha$ -Aktivität zugeschrieben (Bastepe, 2007; Kelsey, 2010).

Als Untereinheit von Gs-Protein gekoppelten, membranständigen Rezeptoren, ist $G\alpha$ bei Bindung eines Liganden an den Rezeptor mit für das Auslösen einer stimulierenden intrazellulären Kaskade verantwortlich. Nach Aktivierung des Gs-Protein gekoppelten Rezeptors dissoziiert die nun GTP-bindende α -Untereinheit vom Protein ab und stimuliert durch Bindung die Adenylycyklase, die wiederum den Spiegel des zyklischen Adenosin-

monophosphats (cAMP) erhöht. (Hamm, 1998). Das cAMP fungiert im Anschluss als second messenger und aktiviert seinerseits wichtige Enzyme für unterschiedlichste Syntheseprozesse. Somit spielt es eine essentielle Rolle bei Prozessen in ganz unterschiedlichen Geweben. Das $G\alpha_s$ -Transkript wird sowohl in Lymphozyten, Nebennieren, weißem Fettgewebe, Knochen und Chondrozyten biallelisch exprimiert (Bastepe et al., 2004; Mantovani et al., 2004).

Imprinting auf dem *GNAS*-Genlocus unterscheidet sich nicht nur in den einzelnen Transkripten (s. Abb. 1.5), sondern auch in den einzelnen Geweben in denen *GNAS* für $G\alpha_s$ codiert (s. Tabelle 1) (Kelsey, 2010).

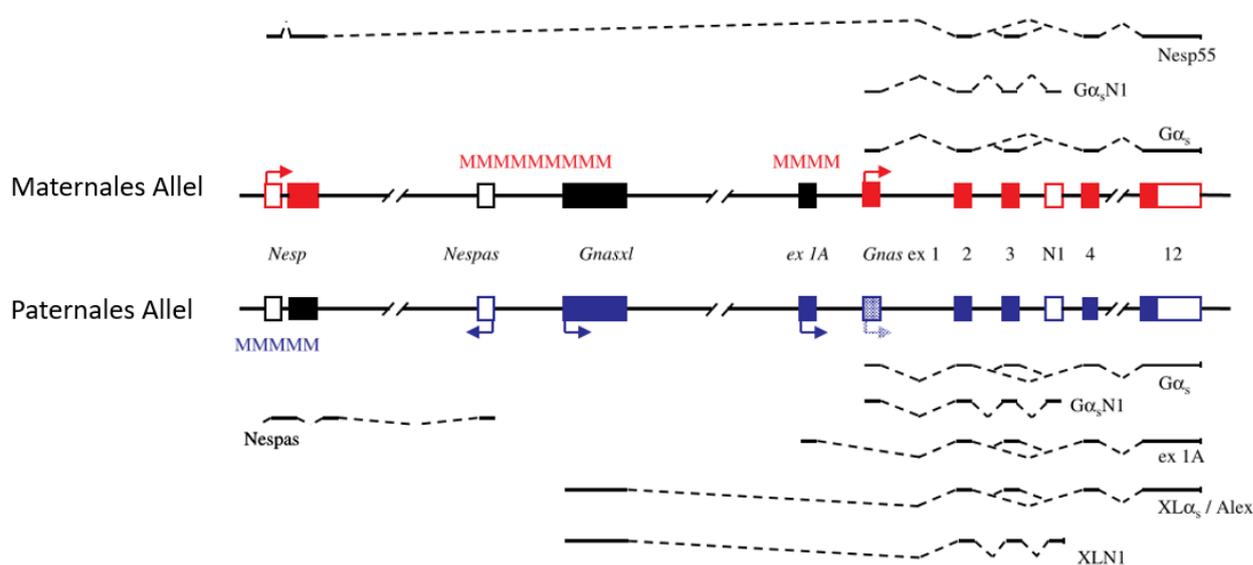


Abb. 1.5: Schema des imprintierten *Gnas*-Locus und seiner Proteine nach Plagge et al. (2008)

Dargestellt sind die Exon-Intron-Struktur (kodierende Exons sind ausgefüllt, nicht-codierende weiß gelassen), Promoteraktivitäten und alternatives Splicing (gestrichelte Linien) des *Gnas*-Locus. Die maternal und paternal aktiven Allele sind rot oder blau hervorgehoben. Die Pfeile zeigen die Promoter und die Transkriptionsrichtung der RNAs an. DMRs sind mit „M“ markiert. *Gnas* wird in den meisten Allelen biallelisch exprimiert (s.o.), mit der Ausnahme einiger weniger Zelltypen (s. Tabelle 1, hier dargestellt durch blau schraffierte Box). *Gnasxl* wird ausschließlich paternal exprimiert. Das Exon 1 von *Gnasxl* wird an die Exons 2-12 von *Gnas* gesplitt (Exon 2-13 im humanen *GNAS*). Das *Gnasxl*-spezifische Exon beinhaltet einen weiteren Transkriptionsstart für das Protein Alex. *Nesp* wird ausschließlich maternal exprimiert. Exon 1A und *Nespas* produzieren nichtkodierende, regulatorische RNAs. Dieses Schema basiert auf dem *Gnas*-Locus der Maus. Der humane ist diesem sehr ähnlich, beinhaltet jedoch 13 Exons. Außerdem ist das NESP-spezifische Exon im Menschen nicht unterbrochen und somit alleinstehend.

Tabelle 1: Auflistung der Gewebe, in denen das Gs α -Transkript monoallelisch exprimiert wird

Gewebe	Exprimierung (Allel)
vorderer Hypophysenlappen	maternal (Hayward et al., 2001; Mantovani et al., 2004)
Schilddrüse	maternal (Germain-Lee et al., 2002; Mantovani et al., 2004)
Ovar	maternal (Germain-Lee et al., 2002; Mantovani et al., 2004)
in der Maus außerdem:	
proximaler Nierentubulus	maternal (Yu et al., 1998)
braunes Fettgewebe	maternal (Yu et al., 1998)
paraventriculärer Nucleus des Hypothalamus	maternal (Chen et al., 2009)

Mutationen und DNA-Methylierungsdefekte, die entweder alleinstehend oder in Folge von Mutationen im *GNAS*-Lokus auftreten, wurden mit Pseudohypoparathyreoidismus Typ 1a (Weinstein et al., 2001), 1b (Bastepe et al., 2003) und 1c (Brix et al., 2014; Thiele et al., 2011), McCune-Albright-Syndrom (Weinstein et al., 1991) und Hypophysentumoren (Landis et al., 1989) in Verbindung gebracht. Mutationen, die zum Pseudohypoparathyreoidismus Typ 1a führen, treten zusammen mit einer milden TSH-Resistenz auf. Aber auch Pseudohypoparathyreoidismus Typ 1b-Patienten, die unter anderem eine Hypomethylierung in der 1A DMR präsentieren, weisen häufig milde TSH-Resistenzen auf. Durch die Komplexität des Gen-Lokus treten die Erkrankungen mit sehr variablen Phänotypen auf, was durch die Imprinting Mechanismen erklärt wird (Kelsey, 2010).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Schilddrüsendysgenese tritt sporadisch und von Jahreszeiten unabhängig auf. Monozygote Zwillinge sind hinsichtlich der Erkrankung regelhaft diskordant. Deshalb kommen epigenetische Konzepte infrage, um das Krankheitsbild auf molekularer Ebene zu erklären.

Der von Romanet et al. (2015) publizierte Fallbericht zeigt, dass DNA-Methylierungsdefekte im *GNAS*-Lokus gemeinsam mit einer kongenitalen Hypothyreose auftreten können. Der beschriebene Fall beschreibt jedoch keine einzeln auftretende Schilddrüsenunterfunktion, sondern eine damit einhergehende PTH-Resistenz.

TRH aus dem Hypothalamus stimuliert TSH in der Hypophyse über einen Gs-Proteingekoppelten Rezeptor. TSH stimuliert ebenfalls über einen Gs-Protein gekoppelten Rezeptor die Schilddrüsenentwicklung während der Embryogenese und die Schilddrüsenhormonbiosynthese. Dies geschieht unter anderem durch Signalwege über den second messenger cAMP, dessen Spiegel bei Aktivierung eines Gs-Protein gekoppelten Rezeptors erhöht wird.

Nguyen et al. schildern (2000) in einem Mausmodell, dass veränderte cAMP-Spiegel durch Blockade des TSH-Rezeptors in der Embryogenese dazu führen, dass die Schilddrüse sich nicht richtig entwickelt. Die zentrale Bedeutung dieses Mechanismus für die Schilddrüsenentwicklung spiegelt sich auch in den starken Hypoplasien wieder, die bei TSHR-Mutationen gefunden wurden (Biebermann et al., 1997).

Veränderte DNA-Methylierungen 5' des ersten Exons des *GNAS*-Gens, das für die G α -Untereinheit codiert, könnten zu einer Dysfunktion des G-Protein gekoppelten TSH-Rezeptors und somit zu veränderten cAMP-Spiegeln führen. Dies könnte möglicherweise eine defekte Schilddrüsenentwicklung verursachen. Tritt ein solcher Methylierungsdefekt nur bei einem Zwilling auf, ließe sich so die Diskordanz epigenetisch erklären.

Die bis jetzt beschriebenen DNA-Methylierungsdefekte haben immer auch zu einer PTH-Resistenz geführt.

Deshalb ist eine Hypothese, dass bei den mit Schilddrüsenunterfunktion erkrankten Zwillingen DNA-Methylierungsdefekte in der Promoterregion 5' des ersten Exons des *GNAS*-Gens liegen, in der bis heute noch keine Defekte beschrieben wurden.

Der 1A DMR des *GNAS*-Gens wird eine Regulierung des *GNAS*-Exon 1-Promoters zugeschrieben (Kelsey, 2010). Deswegen ist vorstellbar, dass bei Defekten im stark methylierten Exon 1A ebenfalls Defekte in der schwach methylierten Promoterregion dahinter entstehen.

Das alternative Exon 1A ist in allen publizierten Pseudohypoparathyreoidismus-Fällen, die mit einer milden TSH-Resistenz einhergehen, mit epigenetischen Veränderungen betroffen (Liu et al., 2003; Mantovani et al., 2007). Auch im (2015) von Romanet et al. publizierten Fallbericht ist diese Region beteiligt.

Deshalb sind sowohl der Bereich des Exon 1A des *GNAS*-Lokus als auch die Promoterregion des ersten Exons von *GNAS* die Haupt-Kandidaten für mögliche Methylierungsdefekte.

Aufgrund dessen sollen sowohl eine Region, die auf dem Exon 1A lokalisiert ist, als auch eine Region in der Promoterregion des Exon 1 (3' von Exon 1A und 5' von Exon 1) Untersuchungsgegenstände der vorliegenden Arbeit sein.

Die Arbeitshypothese ist, dass relevante DNA-Methylierungsunterschiede (z.B. 50% Differenz) in diesen Regionen zur Diskordanz bei monozygoten Zwillingen mit Schilddrüsendifferenz führen können.

Diese Hypothese führt zu folgenden Fragen, die in der Arbeit beantwortet werden sollen:

- 1) Kann mit Pyrosequenzierung die *GNAS*-Lokusmethylierung quantifiziert werden?
- 2) Wie sieht die DNA-Methylierung in den zwei ausgewählten Regionen bei Schilddrüsengesunden aus?
- 3) Unterscheidet sich die *GNAS*-Methylierung bei diskordanten eineiigen Zwillingen mit kongenitaler Hypothyreose aufgrund einer Schilddrüsendifferenz?

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die für die Experimente verwendeten Materialien (siehe Tabelle 2.1) und Geräte (siehe Tabelle 2.2) wurden vom Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie (Charité, Berlin) bereitgestellt.

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten Substanzen, Chemikalien und deren Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
Primer: Oligonukleotide (Sequenzen siehe Tabelle 2.8/9)	Sigma
Puffer für PCR und Pyrosequenzierung: Mango Buffer MgCl ₂ PyroMark Annealing Buffer, version 1 PyroMark Binding Buffer PyroMark Denaturation Solution PyroMark Wash Buffer 10x concentrate	Bioline Bioline Qiagen Qiagen Qiagen Qiagen
Lösungen für die Gelelektrophorese 5xTBE; Zusammensetzung: Tris 54 g/l H ₃ BO ₃ 27,5 g EDTA (0,5M) 20 ml/l in H ₂ O; pH 8,0 Loading-DYE ; Zusammensetzung: Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 0,25 % Glycerol 25 % in H ₂ O	Sonstige
Enzyme: MangoTaq DNA Polym.	Bioline
Reagenzien: dNTP Ethidiumbromid	Bioline Sigma

Bezeichnung	Hersteller
Reagenziensysteme: EZ DNA Methylation Kit Maxwell 16 LEV Blood DNA Kit PyroMark Gold Q24 Reagents QuantiFluor dsDNA System AMPure [®] XP- Kit Streptavidin Sepharose High Performance	Zymo Research Promega Qiagen Promega Agencourt GE Healthcare

Auf Wasser basierende Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser aus der MilliQ-Anlage hergestellt.

Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Fluorometer	Quantus Fluorometer	Biozym
Gelkammern und Spannungsquelle	Whatman compact XS/S, Microcomputer Electrophoresis Power Supply 500/500	Biometra, Renner GmbH
Geldokumentations-system	GeneFlash	Syngene
Heizblock	UNO - Thermoblock	Biometra
Magnetständer	diagenode	diagenode
Mikrowelle	MW 802	Exquisit
MilliQ-Anlage	Millipore Water Purification Systems	Merck Millipore
Pipetten	eppendorf research plus Matrix Multipipette accu-jet pro	Eppendorf Thermo Brand
Pyrosequenzierer	PyroMark Q24	Qiagen
PyroMark - Aufreinigungsstation	PyroMark Q24 Workstation	Qiagen
Software	PyroMark Q24 2.0.6 GraphPad Prism 6	Qiagen Prism
Thermocycler	Mastercycler [®] gradient Speedy Mastercycler nexus eco Mastercycler nexus gradient	Eppendorf

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Thermomixer	ThermoMixer F1.5 ThermoMixer FP	Eppendorf
Tiefkühlschrank	Forma -86C ULT Freezer	Thermo
Vortexer	Vortex Genie 2	Bender und Hobein
Waage	Kern PCB	Kern GmbH
Zentrifugen	Galaxy Mini Centrifuge 5417R/C	VWR Eppendorf

2.2 Untersuchte Proben

Tabelle 2.3: Auflistung der in der Arbeit untersuchten Zwillingspaare

Zwillingpaar	Geschlecht	Diagnose erkrankter Zwilling	Schilddrüsenmorphologie erkrankter Zwilling	Pädiatrisch – endokrinologisches Zentrum
Nr. I	weiblich	primäre CH	Hypoplasie	Charité Berlin
Nr. II	weiblich	primäre CH	Ektopie	Charité Berlin
Nr. III	männlich	primäre CH	Hypoplasie	Charité Berlin
Nr. IV	weiblich	primäre CH	Agnesie	Medizinische Universität Innsbruck
Nr. V	männlich	primäre CH	Hypoplasie	Charité Berlin
Nr. VI	weiblich	primäre CH	Ektopie (Azam et al., 2012)	Wellington Hospital, Neuseeland

Alle in Tabelle 2.3 aufgelisteten Zwillingspaare sind monozygot und hinsichtlich ihrer primären kongenitalen Hypothyreose (CH) diskordant. Die nicht betroffenen Zwillinge jedes Paares sind schilddrüsengesund.

Als Kontrollen (siehe Tabelle 2.4) wurden ebenfalls ausschließlich DNA-Proben von schilddrüsengesunden, adulten Probanden genutzt. Die Arbeit wurde von der örtlichen Ethikkommission genehmigt.

Tabelle 2.4: Auflistung der in der Arbeit verwendeten schilddrüsengesunden Kontrollen

Kontrolle	Geschlecht	Kontrolle	Geschlecht
1	männlich	13	männlich
2	weiblich	14	weiblich
3	weiblich	15	weiblich
4	männlich	16	weiblich
5	männlich	17	weiblich
6	männlich	18	weiblich
7	männlich	19	männlich
8	weiblich	20	männlich
9	männlich	21	weiblich
10	weiblich	22	männlich
11	männlich	23	männlich
12	weiblich	24	männlich

2.3 Erklärung und Durchführung der angewandten Methoden

2.3.1 DNA Isolation aus Leukozyten

Alle DNA-Proben, die im Institut für experimentelle pädiatrische Endokrinologie generiert wurden, wurden aus EDTA-Vollblut mit Hilfe des LEV-Kits (Promega) gewonnen und anschließend bei -20°C im Tiefkühlschrank gelagert.

2.3.2 Natriumbisulfitumwandlung genomischer DNA

Diese Methode wurde erstmalig 1992 beschrieben (Frommer et al., 1992) und wurde durch Clark et al. (1994) optimiert. Inzwischen ist die Bisulfitumwandlung mit anschließenden Sequenzierungsmethoden der Goldstandard für die Quantifizierung des Methylierungsstatus von genomischer DNA oder Teilen davon. Die Methode beruht auf einer selektiven Umwandlung von nicht methyliertem Cytosin zu Uracil. In der späteren PCR (s. 2.2.4) und Sequenzierung (2.3.6) wird dieses Uracil als Thymin gelesen. Eine Methylierung an Position 5 des Pyruvatrings des Cytosins verhindert eine Umwandlung zu Uracil. Eine detaillierte Veranschaulichung, wie die Umwandlung von genomischer DNA zu

Bisulfit-DNA stattfindet, ist in Abb. 2.1 zu finden. In der Arbeit wurde zur Durchführung der dort gezeigten Schritte das EZ DNA Methylation Kit von Zymo Research genutzt. Es wurden von jeder zu untersuchenden Probe 500ng von mit dem Quantus Fluorometer gemessener genomischer DNA umgewandelt und in 20 µl Elution Buffer eluiert.

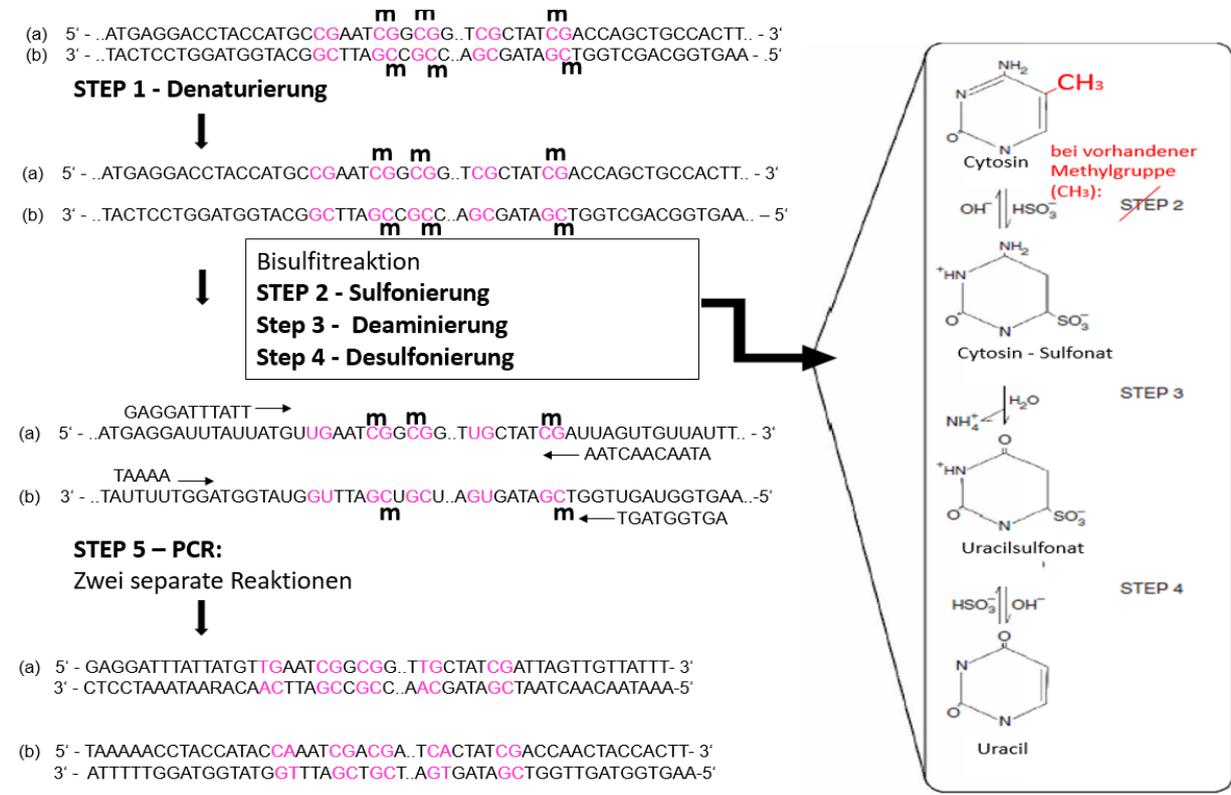


Abb. 2.1: Schema der Bisulfitkonvertierung modifiziert nach Clark et al. (2006)

Eine DNA Sequenz von 5' nach 3' wird zur Veranschaulichung mit dem oberen (a) und komplementären unteren (b) Strang gezeigt. Die CpG Positionen sind pink und methylierte Positionen mit einem schwarzen „m“ markiert. In den Steps 2, 3 und 4 werden alle nicht methylierten Cytosine zu Uracil umgewandelt. Eine Methylierung am C5 des Pyrimidinrings (CH₃, rot) verhindert Step 2. Die DNA liegt einzelsträngig vor und sowohl Strang (a) als auch Strang (b) können mit strang- und bisulfitspezifischen Primern amplifiziert werden. Diese Primer sind in der Abbildung ober- und unterhalb der DNA-Stränge aufgezeigt. In der realen Reaktion sind diese Primer deutlich länger. In der Amplifizierung bei den Vorwärtsprimern werden die Cytosinreste durch Thymin ersetzt und bei den Rückwärtsprimern die Guaninreste (komplementäre Base von Cytosin) durch Adenin.

2.3.3 PCR und Primerdesign

Zur Amplifikation von ausgewählten Regionen der Natriumbisulfit-behandelten DNA-Proben wurde das in der Gentechnologie standardmäßig eingesetzte Verfahren, die Polymerase-Ketten-Reaktion (kurz: PCR), verwendet.

Sie ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung von spezifischen DNA-Fragmenten unter Verwendung von Oligonukleotidprimern und einer Taq-Polymerase. Die Reaktion erfolgt in einem Dreischrittprozess in einem Thermocycler:

Bei der Denaturierung (Schritt 1) werden die DNA-Doppelstränge bei 90°C in ihre beiden Einzelstränge aufgeschmolzen.

Anschließend lagern sich die Primerpaare an (Annealing, Schritt 2), in dem sie über komplementäre Basenpaarung vor und hinter dem zu amplifizierenden DNA-Bereich binden. In der Elongationsphase (Schritt 3) werden diese Primer bei einer Temperatur von 72°C verlängert, in dem in dem PCR-Ansatz vorhandene Desoxyribonukleosidtriphosphate (kurz: dNTPs) eingebaut werden, was zu einer quantitativen Verdopplung der gesuchten DNA-Region führt (Erlich, 1989).

Die Natriumbisulfitumwandlung von Cytosin zu Uracil und somit einem Vorhandensein von nur drei Basen in großen Teilen der DNA, führt zu erhöhten unspezifischen Primerbindungen. Deshalb hat sich für die Bisulfit-PCR als hilfreich erwiesen lange Primersequenzen auszuwählen (25 – 30 Basenpaare (kurz: bp)). Die dadurch erhöhte Annealing Temperatur und die Annahme, dass eine so lange Sequenz nicht mehrmals in der DNA auftritt, machen eine spezifische Bindung der Primer wahrscheinlicher. Für die anschließende Pyrosequenzierung musste außerdem darauf geachtet werden, dass das Amplifikationsprodukt möglichst klein gehalten wird (180 – 300bp). Als Grundlage für das Primerdesign wurde eine Dreizehn-Exonsequenz des humanen GNAS-Gens verwendet, die sich aus der Isoform ENST00000371085 aus der Datenbank „Ensembl“ zusammensetzt. Für jede, der in der Arbeit untersuchten Regionen, wurden per Hand oder mit Hilfe des „Bisulfite Primer Seekers“ unterschiedliche Primerpaare ausgewählt, s. Tabelle 2.7, von denen jeweils nur ein Paar eine spezifische Bindung zeigte. Diese spezifischen Primer sind in Tabelle 2.8 aufgelistet. Es wurde nach dem ersten PCR-Zyklus mit 40 Zyklen ein Aufreinigungsschritt mittels Magnet Beads durchgeführt (s. 2.3.5). Das entstandene Produkt wurde in einer zweiten PCR mit weiteren 20 Zyklen amplifiziert. Die Länge der beiden untersuchten Produkte beträgt bei der Region GNAS1A2 248 Basenpaare und der zweiten Region, GNAS1A1 263 Basenpaare.

In der Arbeit wurden folgende Cycler-Programme für die PCR verwendet:

**GNAS PCR
Programm
1**

mit 40 Zyklus-
durchläufen

Schritt	Temperatur	Zeit (min)
Denaturierung	95°C	2'
	95°C	30"
Annealing	s. Tabelle 2.6	30"
	72°C	30"
Elongation	72°C	8'
Hold	10°C	oo

**GNAS PCR
Programm
2**

mit 20 Zyklusdurch-
läufen

Schritt	Temperatur	Zeit (min)
Denaturierung	95°C	2'
	95°C	30"
Annealing	s. Tabelle 2.6	30"
	72°C	30"
Elongation	72°C	8'
Hold	10°C	oo

Durchführung:

Für eine PCR wurden jeweils 2 µl DNA-Template für die PCR mit den Primern F2.3 und bR2 für die Region GNAS1A2 und 4 µl DNA-Template für die PCR mit den Primern F1.4 und bR1.4 für die Region GNAS1A1 in ein Tube eines 8er PCR-Strips pipettiert. Anschließend wurde mit dem in Tabelle 2.5 dargestellten Ansatz auf 50 µl aufgefüllt. Für die zweite PCR wurden 2,5 µl des aufgereinigten Produkts aus der ersten PCR als Template eingesetzt.

**Tabelle 2. 5:
GNAS PCR
Pipettierschema**

	µl
dH2O	32,5
PCR Mango Buffer (5x)	10
MgCl ₂ (50mM)	1,5
dNTPs (10mM)	0,25
forward primer (10µM)	2
reverse primer (10µM)	2
Taq (Mango, 5u/µl)	0,2
Template	2/4/2,5
Σ	50

Die PCR Bedingungen wurden mit Hilfe einer Gradienten-PCR ermittelt. Hierfür wurden jeweils 12µl des PCR-Mix (2x, 100µl) (s. Pipettierschema, s. Tabelle 2.5) in ein Tube eines PCR KOMBI 8er-Strips pipettiert und anschließend im Thermocycler mit einem Temperaturgradienten von acht unterschiedlichen Temperaturen (s. Tabelle 2.6) durchgeführt.

Tabelle 2.6 GNAS Temperaturgradient 50 – 70 °C:

Positionen	Temperatur in °C
1	51,5
2	53,4
3	55,5
4	58,3
5	61
6	63,7
7	66,1
8	66,8

Tabelle 2.7: Primer, für die keine Spezifität nachgewiesen werden konnte

Oligo Name	Sequence 5' to 3'
GNAS1AF1.2	GAAAATTGGGAGGTAGGTTTGGGAGGT
GNAS1AR1.2	CTTTAAACTTCATAACCATCTTCAACATAATAACCC
GNAS1AF1.3	GTTTTTTGAAGAGGT
GNAS1AR1.3	CTCCTTAATTTAACTC
GNAS1AF1	GGTTAGAAGTTTTGTTTTT
GNAS1AR1	CTCCTTAATTTAACTCTTAAACAC
GNAS1AF2	TAATTTTTAGGTAGTTAGTTTAGTAGTT
GNAS1AF2.2	GTTATTATGTTGAAGATGGTTATGAAGTTTAAAGT

Tabelle 2.8: Die in der Arbeit verwendeten Primer

Oligo Name	Sequence 5' to 3'	Temperatur Annealing
GNAS1AF2.3	GGGTTATTATGTTGAAGATGGTTATGAAG	61°C
GNAS1AbR2	[Btn]GAACTTCTTACTCCT-TATCTATTA AAAAC	61°C
GNAS1ASeq2.3	GATGGTTATGAAGTTTAAAG	s.Pyrosequenzierung
GNAS1AF1.4	GTTATGGGTYGGTTTTTTGAAGAGGTT-GGGG	63,7°C
GNAS1AbR1.4	[Btn]TCCCRACTTACATA-TAAATAAAATACACTCAC	63,7°C
GNAS1ASeq1.2	GAGTTTTTGTTT	s.Pyrosequenzierung

Die Primer bR2 und bR1.4 haben einen Biotinanhang, der für die anschließende Pyrosequenzierung benötigt wird.

2.3.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein analytisches Trennverfahren von Probenkomponenten, das auf ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld auf einem bestimmten Trennmedium beruht. Das Trennmedium ist in diesem Fall ein Agarose-Gel mit Ethidiumbromid. Zur Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurde zunächst 1 % Agarose in 0,5xTBE-Puffer durch Aufkochen vollständig gelöst. Nach Zugabe von Ethidiumbromid (Konzentration: 10 mg / ml) wurde die Suspension in eine Gelvorrichtung mit Kamm gegossen, um anschließend bei Raumtemperatur zu härten. Nach Überführung des Gels in die mit 0,5xTBE-Puffer gefüllte Gelelektrophorese-Apparatur wurde das Gel mit 1,5 µl Easy Ladder I (Referenz-DNA-Leiter) und 3 µl der entsprechenden Produkte (Gradienten - oder PCR - Produkte) + 1µl Loading - DYE beladen. Nach Anlegen einer Spannung von 90 – 100 V für ca. 20 Minuten konnte der Lauf der Proben nachvollzogen und auf die DNA-Leiter beziehend unter UV-Licht im „GeneFlash“ ausgewertet werden.

2.3.5 Aufreinigung der PCR mit Magnet Beads

Die Aufreinigung der PCR-Produkte nach dem ersten PCR-Zyklus und vor der Pyrosequenzierung fand mit Hilfe des AMPure® XP- Kits statt. Das Kit enthält ein Gemisch mit magnetischen Beads, die je nach Konzentration unterschiedlich große DNA-Fragmente binden. Mit Hilfe eines Magnetständers und mehreren Waschschritten konnten so alle Fragmente, die kleiner als das gewünschte Produkt waren (in diesem Fall die aneinander bindenden Primer), weggespült werden.

Um die in etwa 250 bp großen PCR-Produkte aufzureinigen, wurde das 0,75-fache des PCR-Produktes an Bead-Flüssigkeit aus dem Kit zu der aufzureinigenden Probe hinzupipettiert. Nach zehnmütiger Inkubationszeit konnte der Überschuss, der nicht an den Beads haften blieb, mit Hilfe eines Magnetständers, der die Magnete gemeinsam mit dem Produkt an die Tubewand zog, verworfen werden. Das an der Tubewand haftende Produkt wurde auf dem Magnetständer zweimal mit 80%-igem Ethanol gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Im letzten Schritt wurden die Beads in EB-Puffer eluiert und das Eluat wurde ohne die Beads erneut mit Hilfe des Magnetständers in ein neues Tube überführt. Darin war nun das aufgereinigte Produkt enthalten.

2.3.6 Pyrosequenzierung

Um eine quantitative Analyse der DNA-Methylierung durchzuführen, wurde in dieser Arbeit die Pyrosequenzierung genutzt. Die Methode beruht auf der Detektion von einem durch Pyrophosphat generierten Lichtsignal. Schrittweise werden in der Sequenzreaktion Nukleotide eingebaut. Dabei entstehendes Pyrophosphat wird anschließend durch eine Enzymkaskade zu einem Lichtsignal generiert (s. Abb. 2.3), was als Sequenz Signal Peak im sogenannten Pyrogramm (s. Abb. 2.4) resultiert. Die Menge an entstehendem Pyrophosphat und Lichtsignal sind proportional zu der Anzahl der eingebauten Basen (s. Abb. 2.4), (Delaney et al., 2015). Alle Proben wurden unter Beachtung des Pyro Mark User Manuals 2015 pyrosequenziert:

Mit Hilfe von Sepharose Beads, Puffern, Ethanol und einer Aufreinigungsstation wurden die zu sequenzierenden PCR-Produkte in mehreren Schritten so aufgereinigt, dass sie bereit zum Binden an die in Annealing Puffer auf 0,3 μ M verdünnten Sequenzierprimer waren. Die Annealingzeit für die Proben kann variiert werden. In dieser Arbeit wurde das PCR-Produkt-/ Sequenzierprimer-Gemisch zunächst 2 Minuten bei 80°C und anschließend 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einen dafür vorgesehenen „Primerplattenschlitten“ gestellt und anschließend in das Pyrosequenzier-Gerät eingelegt, wo nach und nach über eine zuvor mit Nukleotiden, sowie Enzym- und Substratgemisch befüllte Kartusche, die Reagenzien eingespritzt wurden (s. Abb. 2.3 und Abb. 2.4). Jeder Pyrosequenzierdurchlauf zum Vergleich der Zwillingsmethylierungen wurde doppelt durchgeführt und für die Ergebnisse der Mittelwert der Methylierungsangaben errechnet, um Fehlerquellen zu reduzieren.

Es wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Regionen mittels Pyrosequenzierung untersucht. Die erste Lokalisation (Chromosom (kurz: chr) 20:57,464,343-57,464,388) wird als

GNAS1A1 und die zweite Lokalisation (chr 20:57,464,965-57,465,020) als **GNAS1A2** bezeichnet.

Es wurden jeweils zehn CG Positionen in den ausgewählten Gen-Loki GNAS1A1 und GNAS1A2 untersucht (s. Abb. 2.2).

GNAS1A1

```

CGTTATCGGGTTCGGTTAGAAAGTTTTGTTTTTCGGC
GGGGATATTAGTCGCGTCGATCGCGGAGCGGGTTGCGTTAGGTGGTTGGTCGGCGCGGCGTTTT
TTTTTTTTTTGGTTTCGGGTTGCGGCGCGGCGGTTGGAGCGAGTTTGTGTTTCGGCGGGCGGCG
CGGGCGGTCTAGGCGTTGTTTTGCGTCTGAGTGTATTTATTTATATGTAAGTCGGGA

```

GNAS1A2

```

GGTTATTATGTTGAAATGATGTTATGAAGTTTAAAGTTTCGGCGGCGGAGAGCGAGAAGAAGACGGT
CGCGCGGTTGTCTAGGTGGTTGTCTAAGTTGCGGCGGCGGTTGCGGCGTTGGTCGAGTCGAGAGAG
TCGTTCCGTCGCGAAGAGCGGGATTTGAGAAGTTCGCAAGAATTTAAGAATTCGGCGGGG
AGGCGTTTTTCGAAAATTTTAAATAGATAAGCAGTGAAGAAGTTC

```

Abb. 2.2: In der Arbeit untersuchte CG-Positionen

PCR-Primer blau, Sequenzierprimer pink, in der Pyrosequenzierung untersuchte DNA-Methylierungspositionen gelb unterlegt.

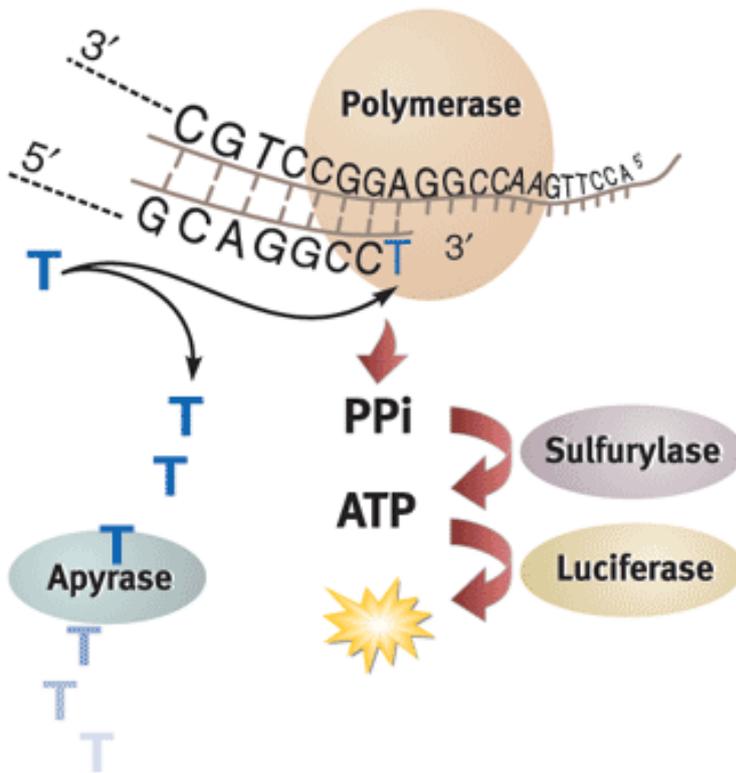


Abb. 2.3: Prinzip der Pyrosequenzierung nach Centre for Genomic Sciences (The University of Hong Kong, 2015)

Nach einem vorher festgelegten Programm werden Nukleotide (hier T) zu einer Probe (hier vereinfacht dargestellt als einzelner DNA-Tochterstrang) hinzugegeben. Die in einem Enzym-/Substratgemisch enthaltene Polymerase baut dieses Nukleotid ein, wodurch Pyrophosphat (PPi) entsteht. PPi wird durch die Sulfurylase aus dem Gemisch zu ATP umgewandelt, das durch die Luciferase ein Lichtsignal generiert. Überschüssiges Nukleotid (T) wird durch die Apyrase wieder abgebaut und steht für den nächsten Sequenzierungsschritt somit nicht mehr zur Verfügung.

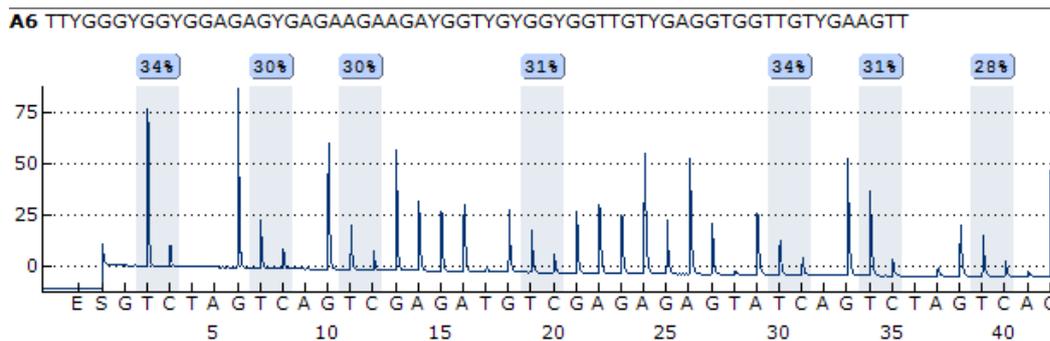


Abb. 2.4: Beispiel eines Pyrogramms für die Region GNAS1A2

Auf der x-Achse ist die Reihenfolge der Nukleotide, in der sie von der Kartusche eingespritzt werden, angegeben. Darunter sind numerisch die Positionen der eingespritzten Nukleotide angegeben. E und S steht für den Enzym/Substratgemisch. Der entstehende Peak an dieser Stelle entsteht durch (hier kaum vorhandene) Verunreinigungen in der Probe oder der Kartusche, die zu Pyrophosphatgenerierung führen. Das bei Nukleotideinbau entstehende Lichtsignal wird als Peak angegeben, dessen Höhe proportional zur Menge des eingebauten Nukleotids steht. An Position 24 wurden beispielsweise doppelt so viele A's eingebaut wie an Position 22. Dies resultiert in einem doppelt so hohen Peak und lässt die Software ein doppeltes AA in der Sequenz angeben. Die Prozentangaben der DNA-Methylierung sind errechnet aus der gemessenen Differenz von T und C (denn methyliertes C wird in der Natriumbisulfidbehandlung (s. 2.2.2) nicht umgewandelt).

2.3.7 Auswertung der Daten

Die qualitative Kontrolle der Pyrosequenzierungsergebnisse erfolgte direkt durch die Qiagen-Software und die statistische Auswertung der Daten mit Hilfe der GraphPad Prism 6-Software.

2.4 Richtlinien

Die DNA-Analysen wurden in dem molekularbiologischen Forschungslabor der Sicherheitsstufe 1 (Gentechnikgesetz) des Instituts für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie durchgeführt. Verantwortlich für die Projektleitung war Prof. Dr. Heiko Krude. Bei den Experimenten und der Erstellung der Dissertation wurden die „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ eingehalten.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA von sechs Zwillingspaaren untersucht, von denen jeweils ein Zwilling an einer Schilddrüsendysgenese erkrankt und der andere gesund ist. Es sollte geprüft werden, ob ein Methylierungsunterschied der DNA im *GNAS*-Lokus als Ursache der Diskordanz der Schilddrüsenfehlbildung vorliegt.

Hierfür wurden zwei Regionen auf dem *GNAS*-Genlokus ausgewählt. Davon liegt die erste (*GNAS1A1*) in der Region des Exon 1A des *GNAS*-Gens und die zweite (*GNAS1A2*) einige Basenpaare 3' zu Exon 1A und 5' zu *GNAS* Exon 1 (s. Abb. 3.1). Diese Regionen wurden mit Hilfe von Pyrosequenzierung analysiert. Diese Methode bietet die Möglichkeit einer quantitativen DNA-Methylierungsanalyse, sodass der Methylierungsgrad der jeweiligen Zwillinge verglichen werden konnte.

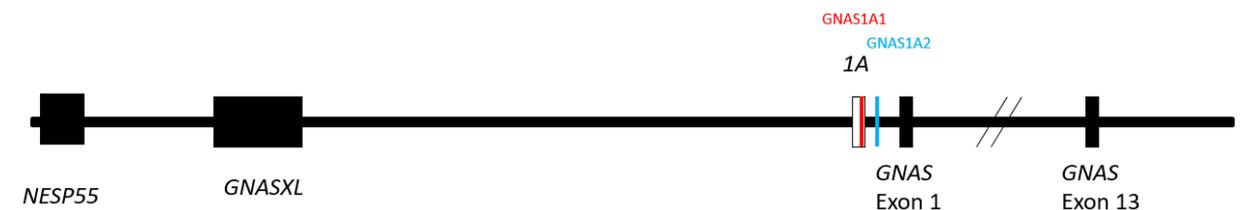


Abb. 3.1: Schema des *GNAS*-Genlokus mit *GNAS1A1* und *GNAS1A2*

Zu sehen ist die Lage der in der Arbeit untersuchten Regionen auf dem Genlokus und ihre örtliche Beziehung zu den Exons. Der *GNAS*-Lokus ist mit seinen alternativen Promotern *NESP55* und *GNASXL* dargestellt. Exon 1A ist weiß, da es als einziges der Exons nicht codiert. Die in der Arbeit untersuchten Regionen sind rot (*GNAS1A1*) und blau (*GNAS1A2*) markiert.

Die Ergebnisse werden entsprechend den Fragestellungen aus 1.5 dargestellt.

3.1 Etablierung der Methode

Zur Analyse der beiden Regionen mittels Pyrosequenzierung musste die zu untersuchende bisulfitemgewandelte DNA zunächst mit Hilfe von PCR amplifiziert werden. Ein Amplifikationsprodukt entstand bei beiden untersuchten Regionen gemeinsam mit einem zweiten, kleineren Produkt (s. Abb. 3.2).

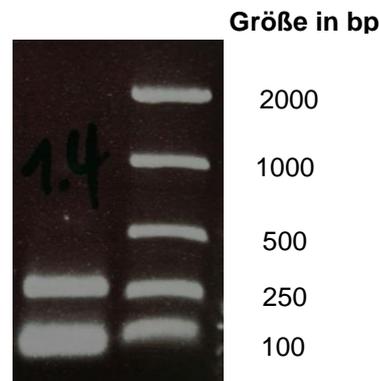


Abb. 3.2: Ethidiumbromidgel-Foto: PCR Produkt

Zu sehen ist rechts die Referenz DNA (Easy Ladder I), die die Größe der Basenpaare von 100 – 2000 anzeigt und links das PCR-Produkt (oberer Balken) und Nebenprodukte (unterer Balken).

Es konnte beobachtet werden, dass ein für die Pyrosequenzierung (s. 2.3.6) ausreichendes PCR-Produkt nur entstehen konnte, wenn die DNA-Qualität hochwertig war. Das bedeutet, dass die DNA neu aus EDTA-Blut gewonnen werden und anschließend nach den oben beschriebenen Angaben in Bisulfit-DNA umgewandelt werden musste.

Da dies nur mit den wenigsten der zu untersuchenden Proben möglich war, wurde in dieser Arbeit nach dem ersten Durchlaufen des Cycler Programms (GNAS PCR Programm 1) ein Aufreinigungsschritt mit Magnet Beads durchgeführt (s. 2.3.5). Das so aufgereinigte Produkt wurde in einer erneuten PCR-Reaktion mit weiteren zwanzig Zyklen (GNAS PCR Programm 2) eingesetzt. Das nach diesem Durchlauf entstandene Produkt war nach einer erneuten Aufreinigung mit den magnetischen Beads nun auch mit qualitativ schlechterer DNA gut genug (s. Abb. 3.3), um Pyrogramme (s. 2.3.6) mit ausreichender Peakhöhe zu erzielen.

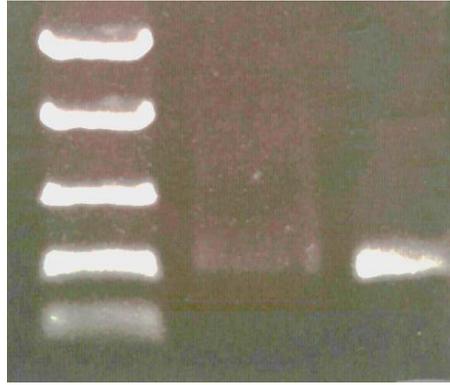


Abb. 3.3: Ethidiumbromidgel-Foto Vergleich 1. (40 Zyklen) und 2. (40+20 Zyklen) PCR

Beispiel eines PCR Produkts vor (links) und nach (rechts) den Aufreinigungsschritten und zweitem PCR Zyklus

Deshalb wurden die in der Arbeit verwendeten Ergebnisse mit einer hohen PCR-Zyklusanzahl von insgesamt 60 generiert.

Vergleicht man nun die durchschnittlichen DNA-Methylierungslevel Schilddrüsengesunder miteinander, so fällt auf, dass die Level der 2.PCR (40+20 Zyklen) im Durchschnitt 5% unter denen der 1.PCR (40 Zyklen) liegen (s. Abb. 3.4).

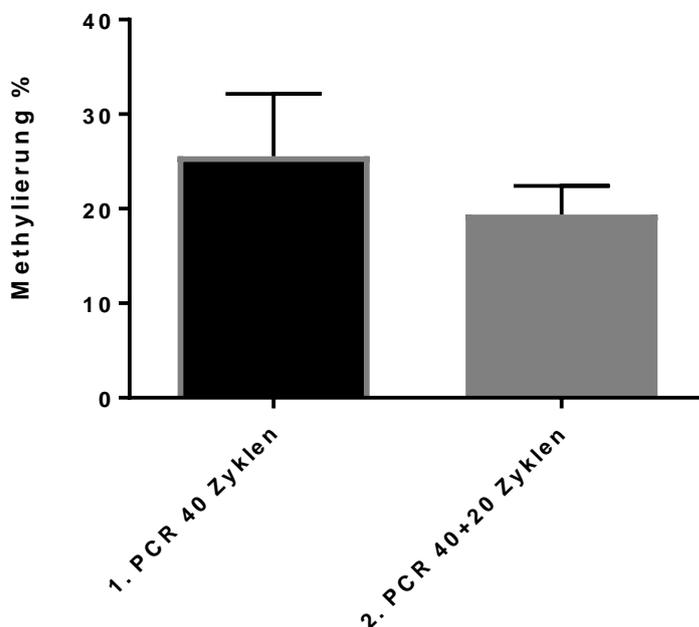


Abb. 3.4: GNAS 1A2 Vergleich der Mittelwerte aller CpG-Positionen nach 40 (1. PCR) und nach 40+20 Zyklen (2.PCR)

Anzahl n=12 (schilddrüsengesunde Kontrollen 12-24)

Dies spiegelt sich auch in Abb. 3.5 wieder: Die Methylierungslevel an allen Positionen unterscheiden sich prozentual um 5-10%. Außerdem ist zu erkennen, dass die Methylierungswerte der einzelnen Proben sich nach den Aufreinigungsschritten und erneuten PCR-Zyklen enger um den Mittelwert verteilen. Die beiden Muster in Abb. 3.5 weisen sich ähnelnde Merkmale auf.

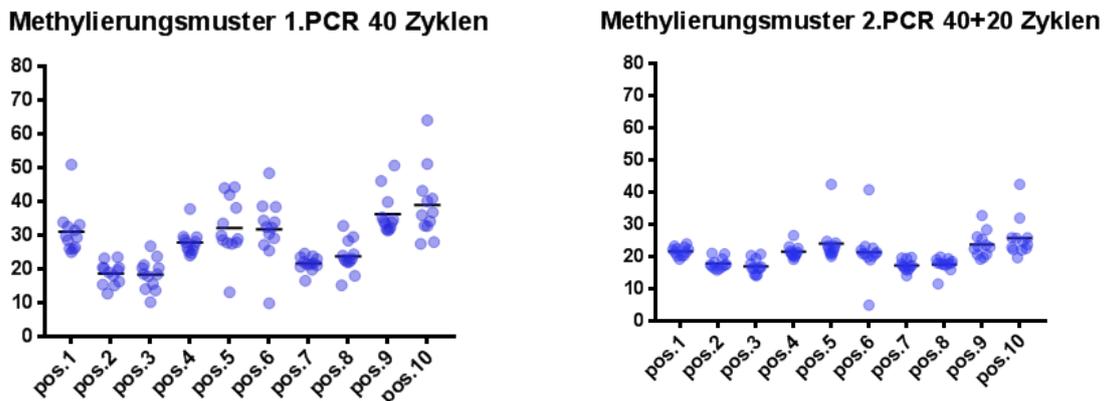


Abb. 3.5: Vergleich GNAS 1A2 DNA-Methylierungsmuster nach 40 Zyklen (1.PCR) mit GNAS 1A2 DNA-Methylierungsmuster nach 40+20 Zyklen (2.PCR)

n=12 (schilddrüsengesunde Kontrollen 12-24)

In beiden Mustern ist ein heterogenes aber paralleles Pattern zu sehen, in dem die höchste Methylierung an Position 10 und die niedrigste an Position 3 zu finden ist. Auch bei der Erstellung weiterer Methylierungsmuster in unabhängigen PCR's mit anderen Kontrollpersonen (Kontrollen 1-12) ließ sich das Pattern reproduzieren (s.Abb. 3.7). Für die folgenden dargestellten Ergebnisse bedeuten die angewandten Aufreinigungsschritte, dass die dargestellten DNA-Methylierungen vermutlich etwa fünf Prozent höher liegen.

3.2 Methylierungsmuster bei Schilddrüsengesunden

Es wurde in beiden Regionen bei zwölf schilddrüsengesunden Kontrollen ein Methylierungsmuster erstellt. Dafür wurden die Werte aller Kontrollen an den jeweils zehn untersuchten CpG-Positionen grafisch dargestellt.

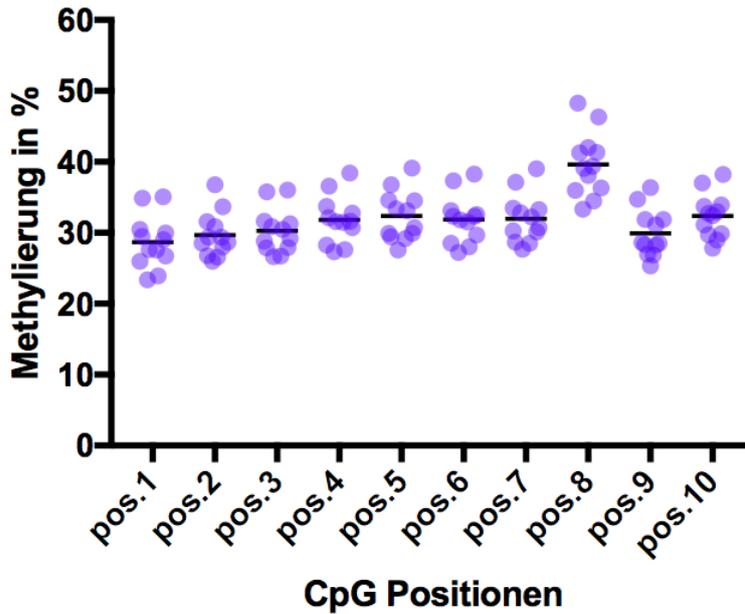


Abb. 3.6: GNAS1A1 DNA-Methylierungsmuster schilddrüsengesunder Kontrollen

n=12 (schilddrüsengesunde Kontrollen 1-12), blau gibt die Werte der einzelnen Kontrollen an, die schwarzen Striche stehen für das mittlere Methylierungslevel an der jeweiligen Position

In der Region GNAS1A1 (s.Abb. 3.6) lässt sich erkennen, dass die Mittelwerte der schilddrüsengesunden Kontrollen bis auf eine Ausnahme um die 30% Methylierung aufweisen. Position 8 ist bei allen Kontrollen auffallend hoch methyliert und im Mittel eher bei 40%.

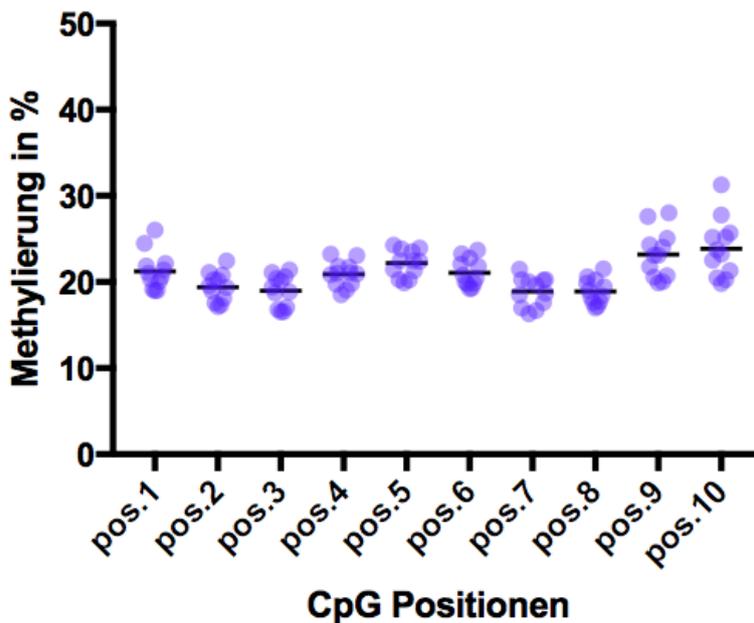


Abb. 3.7: GNAS1A2 DNA-Methylierungsmuster schilddrüsengesunder Kontrollen

n=12 (Kontrollen 1-12), blau gibt die Werte der einzelnen Kontrollen an, die schwarzen Striche stehen für das mittlere Methylierungslevel an der jeweiligen Position

GNAS1A2 (s. Abb. 3.7) zeigt bei schilddrüsengesunden Kontrollen ein um die 20% Methylierung schwankendes Methylierungsmuster. Die höchste Methylierung und gleichzeitig die höchsten Schwankungen unter den Kontrollen sind an Position 10 zu erkennen.

3.3 GNAS1A1 bei diskordanten monozygoten Zwillingen

In der ersten untersuchten Region GNAS1A1, die im Exon 1A des *GNAS*-Lokus liegt (s. Abb. 3.1), konnten geringe DNA-Methylierungsunterschiede zwischen gesunden und erkrankten Zwillingen festgestellt werden (s. Abb. 3.8).

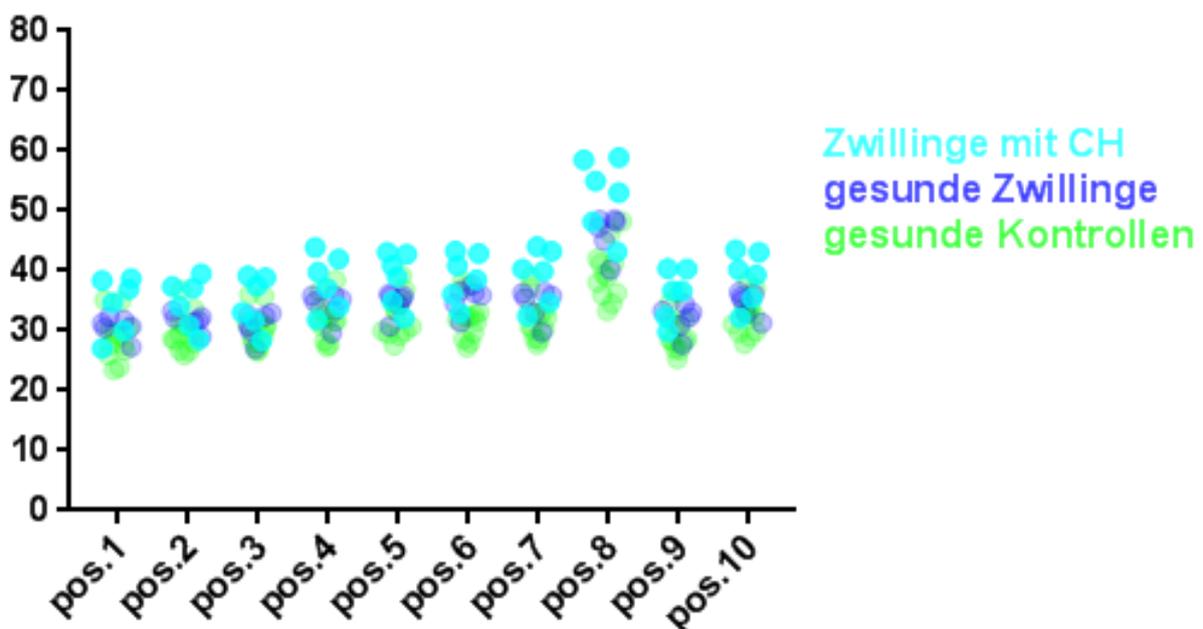


Abb. 3.8: GNAS 1A1 Vergleich der CpG Positionen 1-10 von gesunden und kranken Zwillingen sowie schilddrüsengesunden Kontrollen

n=6 (Zwillinge mit CH), n= 6 (gesunde Zwillinge), n=12 (schilddrüsengesunde Kontrollen 1-12); CH steht für kongenitale Hypothyreose, pos.1-10 für die untersuchten CG-Positionen im jeweiligen DNA-Abschnitt (s. Abb. 2.2)

Einige der an kongenitaler Hypothyreose erkrankten Zwillinge zeigen eine höhere DNA-Methylierung als die ihrer gesunden Geschwister. Der deutlichste Unterschied ist an Position 8 zu erkennen. Außerdem lässt sich veranschaulichen, dass zwei Drittel der erkrankten Zwillinge außerhalb des Bereiches der DNA-Methylierungsschwankungen der gesunden Kontrollen und der gesunden Zwillinge liegen. Darauf basierend werden in Abb. 3.9 noch einmal die DNA-Methylierungen der einzelnen Paare betrachtet.

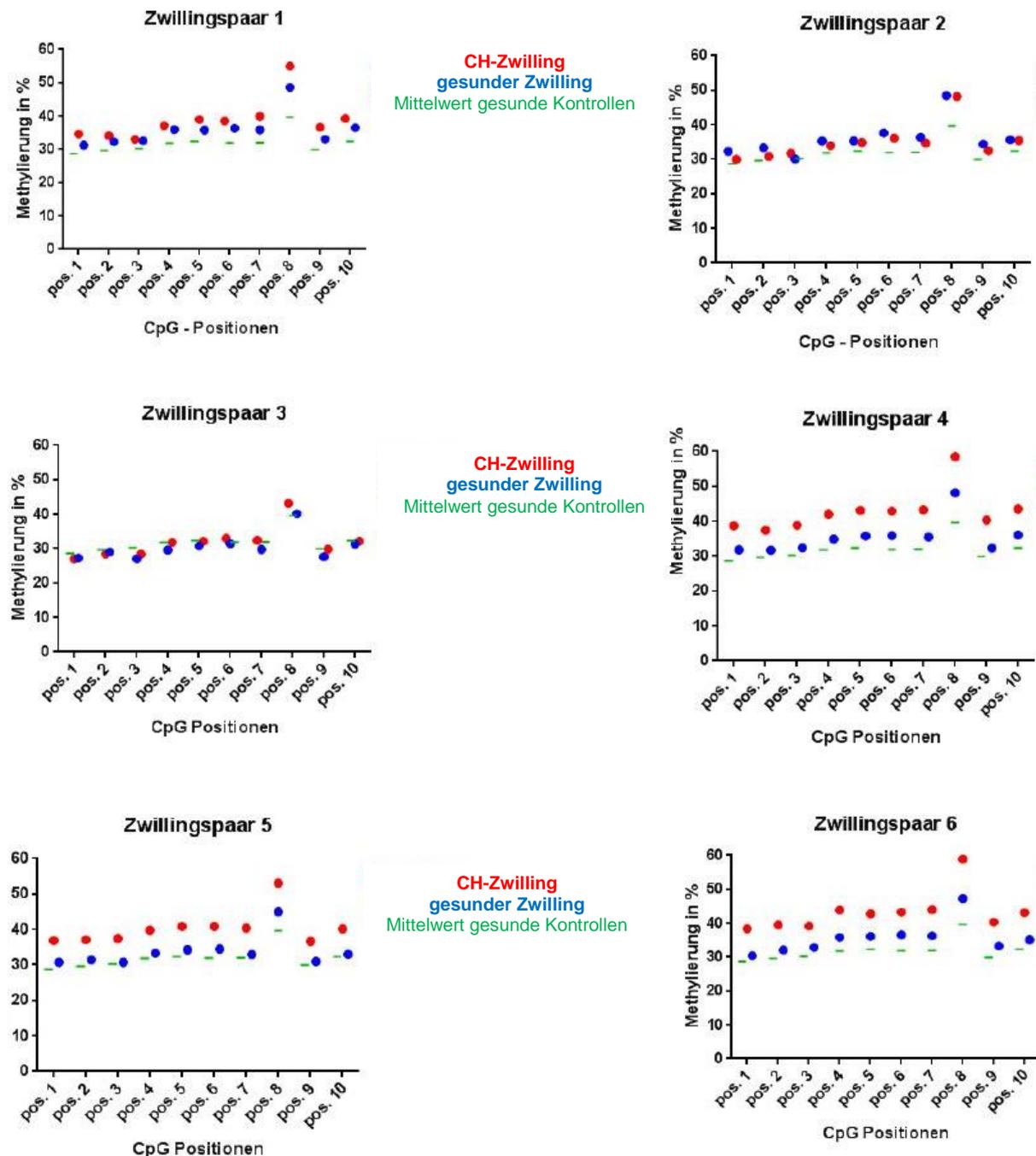


Abb. 3.9: Vergleich der erkrankten Zwillinge mit ihrer genetisch identischen Kontrolle an allen CG-Positionen von GNAS1A1 sowie mit den Mittelwerten der schilddrüsengesunden Kontrollen 1-12

Während die Zwillingspaare 1-3 bis auf Position 8 kaum merkliche Unterschiede in ihren DNA-Methylierungsmustern aufweisen, erkennt man bei den Zwillingspaaren 4-6 Differenzen von bis zu 10%. Auffällig ist außerdem, dass Position 8 sowohl bei den gesunden als auch den erkrankten Zwillingen und den Kontrollen deutlich höher methyliert ist als die benachbarten Positionen. Auch ist an dieser Stelle bei Zwillingspaar 1 und 3 eine größere Differenz als bei den restlichen Positionen zu erkennen. Die Mittelwerte der Kontrollen weisen ähnliche Methylierungslevel wie die gesunden Zwillinge auf.

3.4 GNAS1A2 bei diskordanten monozygoten Zwillingen

Das zweite untersuchte Fragment liegt, wie in Abb. 3.1 dargestellt, zwischen Exon 1A und dem ersten Exon des für die Gs α -Untereinheit codierenden GNAS-Gens.

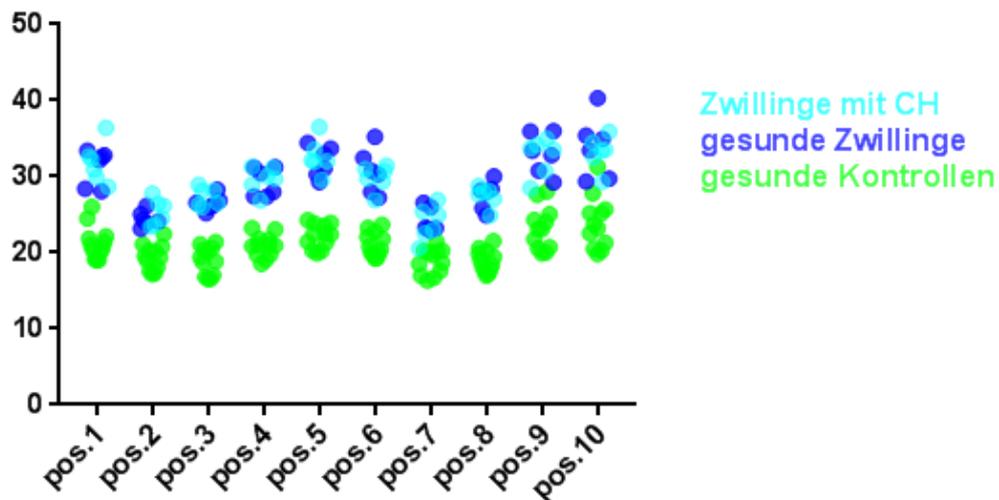


Abb. 3.10: GNAS 1A2 Vergleich der CpG Positionen 1-10 von gesunden und kranken Zwillingen

n=6 (Zwillinge mit CH), n= 6 (gesunde Zwillinge), n=12 (schilddrüsengesunde Kontrollen 1-12); CH steht für kongenitale Hypothyreose, pos.1-10 für die untersuchten CG-Positionen im jeweiligen DNA-Abschnitt (s. Abb. 2.2)

Anders als bei der ersten Lokalisation, weisen die zu vergleichenden Gruppen bei GNAS1A2 keine nennenswerten Unterschiede auf. Dies ändert sich auch bei der Betrachtung der einzelnen Paare in Abb. 3.11 nicht. Auffällig ist jedoch, dass die gesunden Kontrollen niedrigere Methylierungslevel aufweisen als die diskordanten Zwillinge.

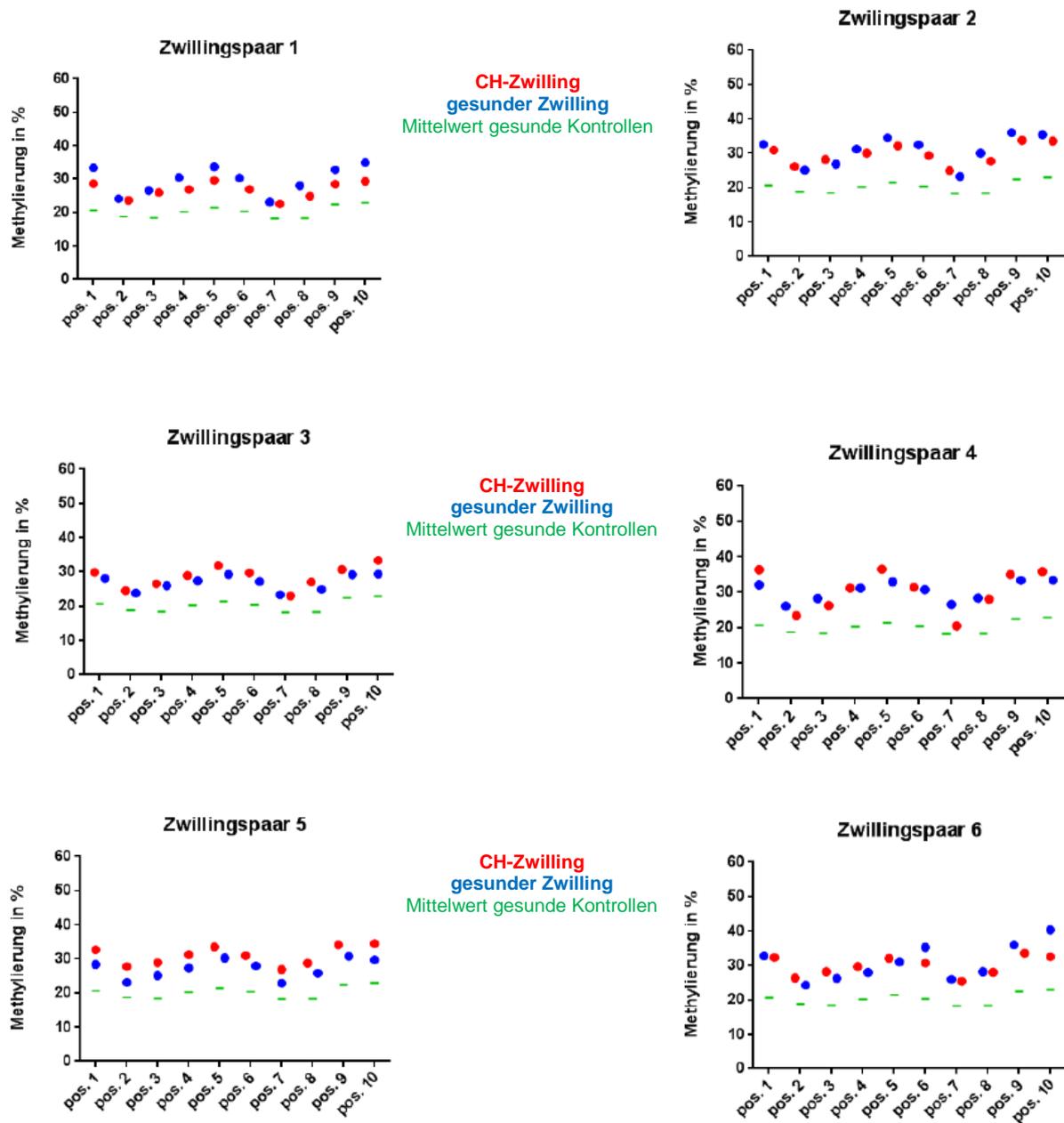


Abb. 3.11: Vergleich der erkrankten Zwillinge mit ihrer genetisch identischen Kontrolle an allen CG-Positionen von GNAS1A2 sowie mit den Mittelwerten der schilddrüsengesunden Kontrollen 1-12

Abb. 3.11 zeigt, dass die Zwillingspaare in Bezug auf das Methylierungsmuster in GNAS1A2 recht homogen sind. Diese weisen nur leichte Schwankungen auf: So sind die erkrankten Zwillinge im Gegensatz zu ihren gesunden Geschwistern mal hypermethyliert (Zwillingspaare 3 und 5), mal hypomethyliert (Zwillingspaar 1). Wie bereits in Abb. 3.10 gesehen, fällt auch hier die niedrigere Methylierung der schilddrüsengesunden Kontrollen auf.

Schaut man sich nun die letzte CG-Position in Abb. 3.12 genauer an, bei der die größten Differenzen zwischen den Zwillingspaaren zu sehen sind, lässt sich erkennen, dass große Schwankungen um 10% nicht nur unter den Zwillingen sondern auch bei gesunden Kontrollen auftreten.

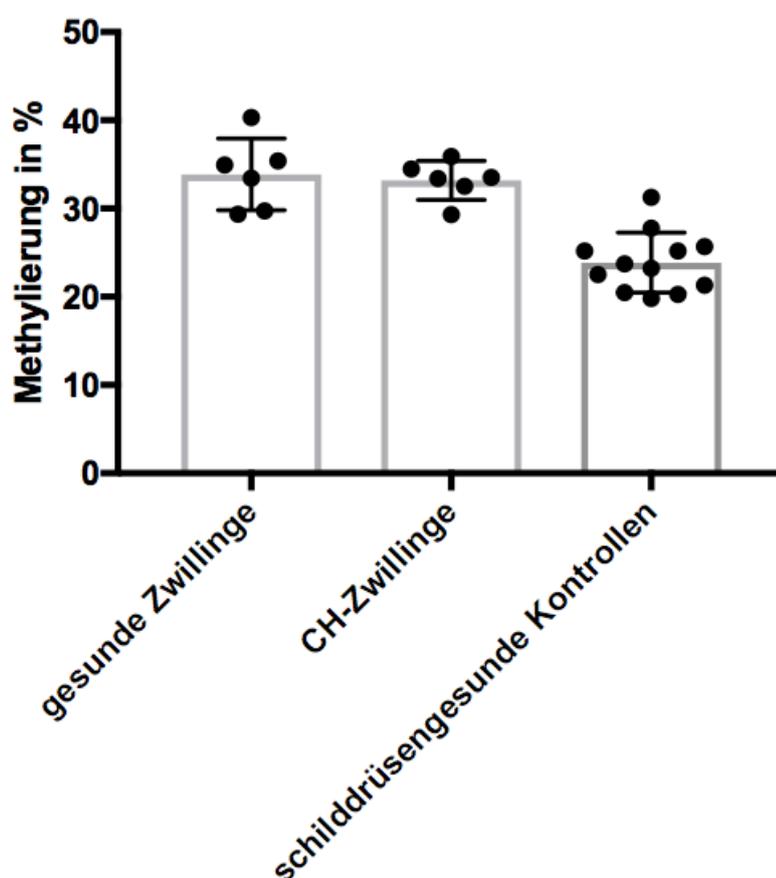


Abb. 3.12: Vergleich der Zwillingspaare und gesunden Kontrollen an Position 10 GNAS1A2

n=6 (gesunde Zwillinge), n=6 (CH-Zwillinge), n=12 (schilddrüsengesunde Kontrollen)

Auffallend ist auch hier, dass die schilddrüsengesunden Kontrollen im Durchschnitt 6% niedriger methyliert sind als die Zwillingspaare.

4 Diskussion

Die primäre kongenitale Hypothyreose ist mit einer Inzidenz von 1:4000 – 1:3000 die häufigste angeborene endokrine Störung. Eine Entwicklungsstörung der Schilddrüse, die Schilddrüsendysgenese, tritt mit 80 – 85% am häufigsten als Ursache der angeborenen Schilddrüsenunterfunktion auf. Die molekulare Ursache der Schilddrüsendysgenesen ist bis heute in etwa 95% der Fälle ungeklärt (Castanet et al., 2010).

Epigenetische Konzepte als Erklärung der Erkrankung kommen in Frage, weil die Schilddrüsendysgenese sporadisch und von Jahreszeiten unabhängig auftritt und eineiige Zwillinge hinsichtlich der Erkrankung regelhaft als diskordant beschrieben werden (Azam et al., 2012; Kühnen et al., 2009; Perry et al., 2002; Warkany und Selkirk, 1955).

DNA-Methylierungsdefekte als epigenetische Modifikation wurden bereits als Ursache für Organmalformationen beschrieben, so zum Beispiel bei diskordanten Zwillingen mit Kau-duplikation (Oates et al., 2006).

Die in der Arbeit untersuchten sechs monozygoten Zwillingspaare sind hinsichtlich der Schilddrüsendysgenese und der damit einhergehenden Schilddrüsenunterfunktion ebenfalls diskordant. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, DNA-Methylierungsdefekte als Ursache für die Schilddrüsendysgenese der diskordanten monozygoten Zwillinge zu beschreiben.

Auf Grundlage eines 2015 publizierten Fallberichts (Romanet et al.), der DNA-Methylierungsdefekte auf dem *GNAS*-Gen mit einer Schilddrüsenunterfunktion in Verbindung bringen konnte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass DNA-Methylierungsdefekte des *GNAS*-Gens zu Diskordanz bei monozygoten Zwillingen mit Schilddrüsendysgenese führen können. Es wurden deshalb zwei Abschnitte des *GNAS*-Gens bei den sechs monozygoten und diskordanten Zwillingen untersucht. Genutzt wurde dafür die Pyrosequenzierung von Bisulfit-umgewandelter DNA (s.Kapitel 2).

4.1 Diskussion der gewählten Region

Defekte des hier untersuchten Genlokus *GNAS* wurden bis heute nur im Zusammenhang mit Resistenzen gegen das Parathormon (kurz: PTH) in Verbindung gebracht, dem sogenannten Pseudohypoparathyreoidismus (s. 1.4). Damit einhergehend können unter anderem auch Resistenzen gegen den TSH-Rezeptors vorliegen (Kelsey, 2010). Auch der Fall von Romanet et al. (2015) beschreibt eine angeborene Hypothyreose nur mit einem damit einhergehenden PTHr und so einer zusätzlichen PTH-Resistenz. Bei den in der

Arbeit untersuchten diskordanten monozygoten Zwillingen mit Schilddrüsendysgenese ist keine PTH-Resistenz nachweisbar. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass DNA-Methylierungsdefekte, die in der Region Exon 1A und im *GNAS*-Promoter auftreten, zu einer alleinigen TSH-Resistenz führen können. Dies erscheint zunächst unwahrscheinlich, da *GNAS* für das G α -Protein, einer Untereinheit von Gs-Proteinen, kodiert (Levine et al., 1980). Dieses Protein spielt eine Rolle bei vielen G-Protein-gekoppelten Signalwegen und erhöht unter anderem bei Aktivierung den second messenger cAMP. Besonders anfällig auf Defekte im *GNAS*-Lokus sind die Organe, in denen *GNAS* monoallelisch exprimiert wird: der vordere Hypophysenlappen, die Schilddrüse und das Ovar (s. Tabelle 1). In diesen Geweben können Defekte auf dem aktiven Allel nicht durch das zweite, in dem Fall inaktive, Allel ausgeglichen werden. Da die Schilddrüsenentwicklung besonders vulnerabel auf cAMP-Schwankungen reagiert (Nguyen et al., 2000), ist es möglich, dass bereits geringe DNA-Methylierungsdefekte zu einer Schilddrüsendysgenese, nicht aber zu sichtbaren phänotypischen Veränderungen bei anderen G-Protein gekoppelten Mechanismen führen. Die bisher veröffentlichten Fälle von PHP mit einhergehender, milder TSH-Resistenz haben gemeinsam, dass sie veränderte Methylierungen im Exon 1A des *GNAS*-Lokus aufweisen (Liu et al., 2003; Mantovani et al., 2007). Auch im (2015) von Romanet et al. publizierten Fallbericht ist diese Region mit betroffen. Deshalb ist die Region im Exon 1A des *GNAS*-Lokus der Haupt-Kandidat für mögliche Methylierungsdefekte. Ebenfalls untersucht wurden CG-Positionen in der Promoterregion von Exon 1 des *GNAS*-Gens. Es ist vorstellbar, dass bei Defekten im methylierten Exon 1A ebenfalls Defekte in der sich 3' von Exon 1A befindenden schwach methylierten Promoterregion des Exon 1 gefunden werden können. Deshalb ist auch die Wahl dieser zweiten Region berechtigt.

4.2 Diskussion der Methoden

4.2.1 Etablierung der Methode

Wie in Abb. 3.2 zu sehen ist, konnte ein Amplifikationsprodukt der zu untersuchenden Bisulfit-DNA immer nur gemeinsam mit einem zweiten, kleineren Produkt nachgewiesen werden. Das zweite Produkt hat eine Länge von etwas weniger als 100 bp, wie auf der Referenz-DNA-Leiter abzulesen ist. Deshalb stellt dieses Produkt vermutlich aneinanderbindende Vorwärts- und Rückwärtsprimer dar. Die Entstehung des Produkts ließ sich auch nicht mit niedrigeren Primerkonzentrationen in der Reaktion vermeiden. Dadurch

lässt sich vermuten, dass die Bindung der in der Arbeit genutzten Primer immer noch recht schwach ist.

Durch die bisulfitumgewandelte DNA sind Poly(dT)-Abschnitte entstanden. Das bedeutet, dass an vielen Stellen des GNAS-Lokus mehrere Thyminbasen (Beispiel in Abb. 4.1) aufeinander folgen. Dies erschwert die Suche nach spezifisch bindenden Primern. Die schlechte Primerbindung führte vermutlich zu der erschwerten DNA-Amplifizierung mittels PCR, was Aufreinigungsschritte und insgesamt 60 PCR-Zyklen nötig machte (s. 3.1). Weil Ergebnisse durch eine so hohe Anzahl an Zyklen häufig verfälscht werden, fand eine pyrosequenzier-gestützte Kontrolle der Ergebnisse nach den ersten 40 Zyklen und den darauffolgenden 20 Zyklen statt.

Da die Bindung der Primer in GNAS1A2 etwas stärker zu erreichen war als in GNAS1A1, war es möglich, einen Vergleich von einer PCR mit 40 Zyklen und anschließenden 20 Zyklen mit dem daraus aufgereinigten Produkt durchzuführen.

Die daraus entstandenen Ergebnisse zeigen, dass die Methylierungsangaben der 2.PCR (40+20 Zyklen) (s. Abb. 3.4) prozentual 5% unter denen der 1.PCR (40 Zyklen) liegen. Außerdem ist die Streuung nach 40 Zyklen höher als nach 40+20. Dies ist auch bei Betrachtung der einzelnen CpG-Positionen in Abb. 3.5 sichtbar. Die Methylierungsmuster nach 40+20 Zyklen sind zwar 5-10% niedriger, aber ähneln sich. Außerdem ist das Methylierungsmuster in allen Proben stabil und die Werte sind in voneinander unabhängigen PCRs und Pyrosequenzierungen reproduzierbar. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass Aufreinigungsschritte und weitere PCR Zyklen die generierten Ergebnisse nicht wesentlich verfälschen.

Diese Aussage wurde auch auf den analysierten Abschnitt GNAS1A1 übertragen. Es ist gut möglich, dass sich GNAS1A1 ähnlich verhält wie GNAS1A2. Dies ist vor allem wegen der hier ebenfalls stabilen Methylierungspattern in allen Proben von GNAS1A1 wahrscheinlich. Die Werte konnten in allen Kontrollläufen mit unabhängigen PCRs und Aufreinigungsschritten reproduziert werden. Dennoch hätte eine Kontrolle wie bei GNAS1A2 zur Etablierung der Region stattfinden sollen. Dies war durch die unspezifische Primerbindung nicht möglich.

4.2.2 Pyrosequenzierung von bisulfitumgewandelter DNA

Pyrosequenzierung ist eine zuverlässige Methode für eine präzise quantitative Analyse von DNA-Methylierungen. Durch die geringe Leseweite von maximal 100 bp pro Sequen-

zierprimer ist es jedoch sehr aufwendig, große Teile der DNA-Methylierungen zu analysieren (Mashayekhi und Ronaghi, 2007). In den untersuchten DNA-Abschnitten konnten qualitative Pyrogramme nur bei den ersten zehn CG-Positionen und so ca. 50bp erzielt werden.

Bei der Pyrosequenzierung ist nur bei drei oder vier gleichen aufeinanderfolgenden Nukleotiden eine strikte Korrelation zwischen Lichtsignal und Menge an eingebautem Nukleotid zu erwarten. Ab einer Länge von fünf Thymidinen ist eine zuverlässige Quantifizierung von darauf folgenden DNA-Methylierungsstellen also nicht mehr gegeben (Lehmann, 2008). Dies erklärt auch die geringe Leseweite in den untersuchten Regionen. Durch diese Limitationen konnten nur wenige CpG-Positionen (insgesamt 20) im GNAS-Lokus analysiert werden.

4.2.3 Leukozyten-DNA

Die in der Arbeit untersuchten DNA-Proben wurden ausschließlich aus Leukozyten gewonnen. Es wurden Fehler in der DNA-Methylierung beschrieben, die sich in allen drei Keimblättern widerspiegeln (Tufarelli et al., 2003).

Bei der Schilddrüsendysgenese handelt es sich um einen Entwicklungsdefekt der ersten Wochen in der Embryonalentwicklung. Deshalb wird davon ausgegangen, dass DNA-Methylierungsdefekte, die einen Einfluss darauf haben, schon vor der Ausdifferenzierung der drei Keimblätter entstanden sein müssen.

Daraus wird geschlossen, dass diese Defekte sich in allen drei Keimblättern und ihren Derivaten widerspiegeln und so in Leukozyten genauso wie in Schilddrüsengewebe nachweisbar sein müssten.

Der GNAS-Lokus ist gewebsspezifisch imprinted und das G α -Transkript wird in Hypophyse, Schilddrüse und Ovar maternal exprimiert (Germain-Lee et al., 2002; Hayward et al., 2001; Mantovani et al., 2004). Klenke et al. fanden in einer Studie (2011) jedoch heraus, dass auch eine Linie von Vorläuferzellen von Leukozyten, die Lymphoblasten, imprinted sind, maternal exprimiert werden und somit möglicherweise ähnliche DNA-Methylierungsmuster aufweisen wie die Schilddrüsen-DNA. Die DNA-Methylierungsmuster der Leukozyten-DNA sollten jedoch in weiteren Untersuchungen mit dem Muster von Schilddrüsen-DNA gleicher Individuen verglichen werden.

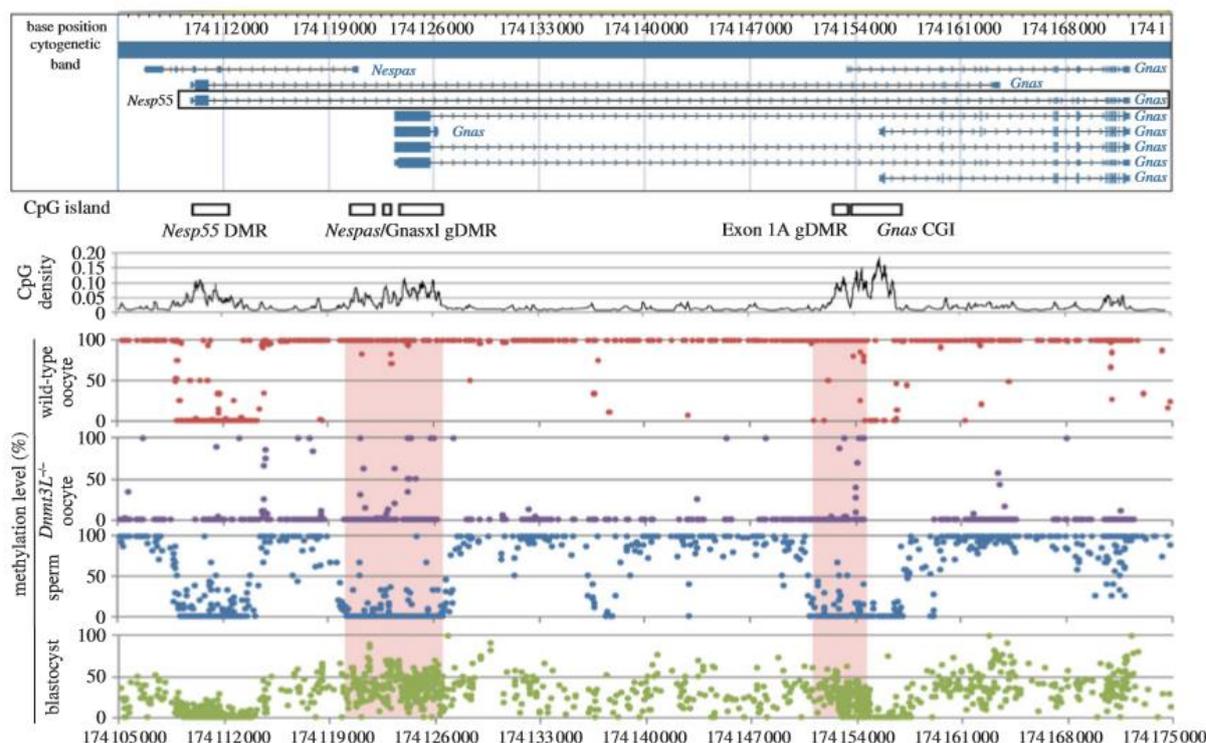


Abb. 4.2: *Gnas*-Methylierung in Oozyten, Spermien und Blastozysten von Mäusen aus Kelsey und Feil (2013)

Die Abbildung veranschaulicht die Methylierung von Oozyten, Spermien und Blastozysten von Mäusen im imprinteten *Gnas*-Lokus. Der obere Balken veranschaulicht die Lokalisation der CpG-Inseln und DMRs im Lokus in Korrelation mit den einzelnen Transkripten und alternativen Exons. Die Lokalisationen der CpG-Inseln sind als offene Boxen darunter aufgeführt. Der Balken „CpG density“ zeigt die Dichte an auftretenden CG-Positionen an. Darunter werden die durch genomweite Bisulfitsequenzierung gewonnenen Methylierungslevel von Wildtypoozyten, *Dnmt3L*^{-/-}-Oozyten, Spermien und Blastozysten angegeben. Jeder Punkt steht für das durchschnittliche Methylierungslevel einer einzelnen CG-Position. Die DMRs *Nespas/Gnasx1* und Exon 1A sind pink markiert. Wie erwartet sind die DMRs in Spermien unmethyliert, in Oozyten methyliert und haben intermediäre Methylierungslevel in Blastozysten-DNA. Die CG-Inselle des *Gnas*-Promoters (hier: *Gnas*CGI) stellt sich in allen Proben als unmethyliert dar. DNMT3L ist eine DNA-Methyltransferase, die, wie in der Abbildung zu erkennen, essenziell für die Methylierungsprozesse ist. Bei Abwesenheit (s. *Dnmt3L*^{-/-}-Oozyten) kann keine Methylierung in Oozyten stattfinden.

Anders als in den Publikationen Ellis und Romanets (2014; 2015) wurde das Methylierungsmuster bei Schilddrüsengesunden in der Region *GNAS1A1* bei Werten um die 30% Methylierung gefunden (s. Abb. 3.6.). Die Werte liegen nach 40+20 PCR-Zyklen vermutlich um etwa 5% niedriger vor (s. 3.1). Doch auch unter Berücksichtigung dessen unterscheiden sich die Werte noch um etwa 15% von den publizierten Methylierungsleveln der Exon 1A DMR. Es sollte bedacht werden, dass in den vorliegenden Ergebnissen eine Streuung der schilddrüsengesunden Kontrollen von beinahe 10% zu beobachten ist. Es müssten in weiteren Arbeiten Methylierungsmustern von größeren Kontrollgruppen erstellt werden, um diese Werte sicher einordnen zu können.

In der Literatur sind zu den hier untersuchten CG-Positionen keine quantitativen Daten von gesunden Menschen zu finden. In Kelseys Mausmodell (s. Abb. 4.2) ist jedoch zu sehen, dass Methylierungswerte in Blastozysten sich im Mittel ebenfalls unterhalb der 50% anordnen.

Die zu Exon 1A publizierten Werte von Elli et al. (2014) geben die Methylierungswerte von fünf CG-Positionen im Bereich chr 20:57,463,553-57,463,848 an, die weiter 5' der Exon 1A DMR lokalisiert sind als der in dieser Arbeit untersuchte Abschnitt GNAS1A1.

In der Region GNAS1A1 wurden die CG-Positionen am 3' Ende des Exon 1A an chr 20:57,464,343-57,464,388 untersucht. Deshalb ist eine mögliche Erklärung, dass die Methylierung an diesem Übergang vom stark methylierten Exon 1A zur schwach methylierten Promoterregion schon unterhalb des Methylierungslevels von 50% liegt.

Im Mausmodell Kelseys (s. Abb. 4.2) ist 3' zu Exon 1A und 5' zum ersten Exon des *GNAS*-Gens ein starker Abfall der Methylierung bis hin zur Demethylierung in allen Proben zu erkennen. Die Region GNAS1A2 zeigt im Methylierungspattern von Schilddrüsengesunden jedoch Werte um die 20%.

Die quantitative Methylierung der gesamten Promoterregion vor Exon 1 wurde beim Menschen bis heute noch nicht veröffentlicht. Im Rahmen des ENCODE-Projekts (ENCODE: Encyclopedia of DNA Elements), das vom National Human Genome Research Institute (kurz: NHGRI) 2007 gegründet wurde, wurden jedoch die ersten drei der hier untersuchten CG-Positionen mittels Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) und Infinium Human Methylation 450 platform untersucht. Beide Methoden sind genomweite Bisulfitsequenziermethoden, mit der in den untersuchten Regionen zwischen nicht methylierten und methylierten Cytosinen unterschieden werden kann. Es wird ein Überblick des Methyloms erstellt aber nicht jede CG-Position erfasst. Untersucht wurden in diesem Bereich unterschiedliche Zelllinien durch das Dr. Richard Myers Lab des Hudson Alpha Instituts für Biotechnologie, die sowohl Krebszellen als auch gesunde humane Blutzellen umfassen. Bei den hier angegebenen ersten drei CG-Positionen in der Region GNAS1A2 an chr 20:57,464,965-57,465,020 sieht man in allen Zelllinien ebenfalls eine vorhandene Methylierung (Myers), sodass die hier dargestellten Ergebnisse unterstützt werden.

Die meisten Imprinting-Cluster der Maus sind mit denen des Menschen vergleichbar (Wan und Bartolomei, 2008). Anhand der in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse ist

aber gut vorstellbar, dass Maus und Mensch in der Promoterregion des *GNAS* unterschiedliche Methylierungen aufweisen. Dafür sprechen auch die Ergebnisse des ENCODE-Projekts. Doch auch in der Region *GNAS1A2* sollten quantitative Methylierungspattern von größeren Kontrollgruppen erstellt werden, um diese Aussage verifizieren zu können.

4.3.3 GNAS1A1

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass relevante DNA-Methylierungsunterschiede (z.B. 50% Differenz) zwischen gesunden und erkrankten Zwillingen im Bereich der untersuchten Regionen nachgewiesen werden können. Diese Annahme konnte mit den Ergebnissen nicht bestätigt werden.

Die erkrankten Zwillinge 4, 5 und 6 in *GNAS1A1* zeigen eine geringe Hypermethylierung von bis zu 10% (s. Abb. 3.9) an allen Positionen im Vergleich zu ihren gesunden Geschwistern. Diese Differenzen sind damit deutlich geringer als solche, die sonst mit Erkrankungen in Verbindung gebracht werden konnten. So sind die Differenzen im von Romanet et al. (2015) beschriebenen Fall zwischen der Patientin und gesunden Kontrollen bei etwa 40%.

In den Abbildungen Abb. 3.6 und Abb. 3.8 ist zu erkennen, dass die Streuung der Methylierungslevel mit steigender Gruppenanzahl zunimmt. Wären die Gruppen der Zwillinge größer, ist vorstellbar, dass sich auch die Werte gesunder Zwillinge ähnlich verhalten, wie in den Paaren 4, 5 und 6. Deshalb ist als Erklärung für den gefundenen Methylierungsunterschied ein zufälliges Auftreten von Methylierungsdifferenzen in den drei genannten Zwillingspaaren als wahrscheinlich anzunehmen. Um diese zufälligen Unterschiede auszuschließen bzw. zu bestätigen, müsste in einer größeren Gruppe von monozygoten Zwillingen die Variabilität der Methylierung an diesen Positionen untersucht werden.

Auch wenn die Daten in zwei voneinander unabhängigen Versuchen reproduziert werden konnten, sind Methodikfehler, die zu solchen Differenzen führen ebenfalls als mögliche Ursache der Unterschiede nicht auszuschließen. Auffallend ist, dass die DNA-Proben der drei sich unterscheidenden Zwillingspaare diejenigen sind, die nicht innerhalb der Charité generiert, sondern eingeschickt wurden. Es sollte kontrolliert werden, wie stabil die Methylierungsmuster an diesen Positionen in Abhängigkeit von der DNA-Aufbereitung sind. Dabei sollte auch berücksichtigt werden, ob die Muster sich durch Probenversand und

durch unterschiedliche Lagerung verändern können. Ebenfalls sollte untersucht werden, ob die Zeit zwischen Entnahme des Blutes und Umwandlung zu DNA eine Rolle spielt. Falls nachgewiesen werden sollte, dass die Methylierungsunterschiede in den drei Zwillingspaaren unabhängig von den hier diskutierten Einflussfaktoren unverändert bleiben, müssen weitere Studien folgen, um deren Relevanz für die Pathogenese der Schilddrüsenerkrankung nachzuweisen. Hierfür müsste z.B. in weiteren diskordanten Zwillingspaaren mit kongenitaler Hypothyreose nach diesem Unterschied gesucht werden.

DNA-Methylierungen werden mit einer inaktiven Genexpression in Verbindung gebracht. Das könnte dafür sprechen, dass die Funktion von Exon 1A bei schon gering erhöhten Methylierungsleveln eingeschränkt ist.

Geht man davon aus, dass die Hypermethylierungen einen pathogenetischen Wert haben, muss zunächst die Funktion von Exon 1A näher beleuchtet werden.

Die Expression mit Verwendung des Exon 1A führt zu einem alternativen Transkript des GNAS-Lokus, das ausschließlich vom paternalen Allel exprimiert wird. Da Exon 1A kein Codon für den Translationsstart aufweist, scheint sein Transkript nicht für ein Protein zu kodieren (s. Abb. 4.3). Es wirkt so, als spiele es vor allem eine Rolle in der Imprinting-Kontrolle des Genlokus als DMR (s. 1.4; (Kelsey, 2010)).

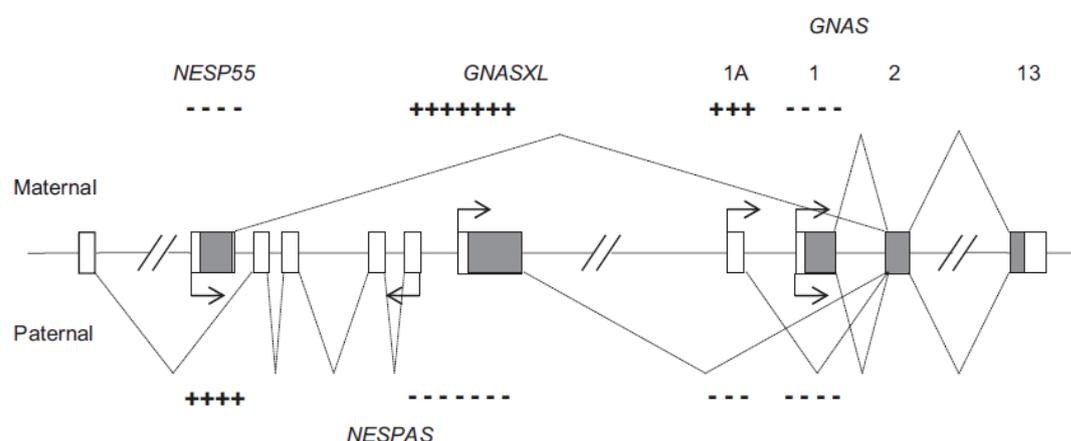


Abb. 4.3: Schema des GNAS-Genlokus nach Kelsey (2010)

Die Eigenschaften des mütterlichen Allels sind oberhalb und die des paternalen Allels unterhalb der Linie dargestellt. Die DMRs sind mit „---“ für das unmethylierte und „+++“ für das methylierte Allel gekennzeichnet. Codierende Exons werden grau dargestellt und nichtcodierende Exons oder Regionen weiß. Aus Gründen der Einfachheit sind Exons 3-12 und kleinere alternativ gespligte Exons ausgelassen. Die Splicingmuster sind mit den hellgrauen Linien dargestellt. Nicht alle Splicingabläufe des NESPAS-Transkripts sind dargestellt. Die Pfeile zeigen den Transkriptionsstart in der jeweiligen Transkriptionsrichtung an. Das Schema ist nicht maßstabsgerecht.

In der Literatur wurde in der Exon 1A DMR bis heute nur ein „Loss of methylation“ (LOM), eine Hypomethylierung, beschrieben (Jan de Beur et al., 2003; Liu et al., 2000; Maupetit-Mehouas et al., 2011).

Es wird davon ausgegangen, dass ein LOM mit einer fehlenden Aktivität von der G α -Untereinheit des Gs-Proteins einhergeht und so Hormonresistenzen gegen PTH oder auch TSH entstehen können. Jedoch ist bis heute der funktionelle Zusammenhang zwischen Exon 1A und *GNAS* nicht gänzlich verstanden (Tafaj und Juppner, 2017). Der beschriebene LOM ist das Gegenteil der in dieser Arbeit möglicherweise gefundenen Hypermethylierung, eines „Gain of methylation“ (GOM).

Im Mausexperiment wurde bei einer Repression des paternalen Allels bei Exon 1A eine gleichzeitige Derepression des *Gnas*-Promoters bewirkt (Williamson et al., 2004).

Setzt man eine Repression nun mit einer Hypermethylierung des paternalen Allels gleich, so kann davon ausgegangen werden, dass auch bei den erkrankten Zwillingen eine Derepression des *GNAS*-Promotors folgt. Dies würde mit einer verstärkten Expression des *GNAS*-Transkripts einhergehen. Es wird nicht ausgeschlossen, dass eine DNA-Methylierungsänderung in dieser Region ebenfalls mit einer Infunktionalität des G-Proteins einhergehen könnte. Ob eine Hypermethylierung in dieser Region überhaupt zu einer fehlenden Aktivität der G α -Untereinheit des Gs-Proteins und damit des TSH-Rezeptors führen könnte, kann erst gänzlich geklärt werden, wenn ein besseres Verständnis für die Funktion von Exon 1A erlangt wurde. Dass geringe Methylierungsdifferenzen von 10% zu einem derart stark ausgeprägten Phänotyp wie einer Schilddrüsendysgenese führen können, wurde bis heute jedoch in der Literatur nicht beschrieben. Dies macht die Hypothese, den geringen Hypermethylierungen einen pathologischen Wert zuzuschreiben, eher unwahrscheinlich.

4.3.4 *GNAS1A2*

Die zweite untersuchte Region *GNAS1A2* liegt 5' zu Exon 1 des *GNAS*-Gens und einige Basenpaare 3' zu Exon 1A und der Region *GNAS1A1* (s. Abb. 3.1 und Abb. 4.1). Es konnten keine Unterschiede in dieser Region bei den diskordanten Zwillingen festgestellt werden (s. Abb. 3.10 und Abb. 3.11).

Auffallend in den Ergebnissen der Region *GNAS1A2* ist, dass die gesunden Kontrollen insgesamt schwächer methyliert sind als die monozygoten Zwillinge. Da jedoch die gesunden Zwillinge ebenfalls höher methyliert sind als die schilddrüsengesunden Kontrollen

(s. Abb. 3.10, Abb. 3.11, Abb. 3.12), lässt sich daraus kein pathogenetischer Zusammenhang zur Schilddrüsendysgenese herstellen. In Abb. 3.5 sieht man, dass bei Kontrollen mit anderen schilddrüsengesunden Individuen die Mehrzahl ähnliche Werte aufweist wie die Kontrollen in Abb. 3.10 mit anderen Proben. Ebenfalls sichtbar sind jedoch Ausreißer an den Positionen 5, 6, 9 und 10. Dies lässt vermuten, dass die Ergebnisse eher zufällig zustande gekommen sind und in größeren Kohorten keine Unterschiede zwischen Kontrollen und Zwillingen mehr sichtbar wären. Methodikfehler, die zu diesen Ergebnissen führen, sind ebenfalls nicht auszuschließen. Die DNA der Kontrollen wurde neu aus EDTA-Blut gewonnen, während die DNA der Zwillinge zu einem weit früheren Zeitpunkt und mit anderen Methoden generiert wurde. Ebenfalls wurde die DNA der Kontrollen und Zwillinge nicht zum selben Zeitpunkt bisulfit-umgewandelt. Dies birgt eine weitere mögliche Fehlerquelle. Wie bereits für die Region GNAS1A1 (s. 4.3.3) beschrieben, sollte auch hier überprüft werden, wie stabil die Methylierungsmuster bei unterschiedlicher Behandlung der DNA bleiben.

Eine Hypothese der Arbeit war, dass Methylierungsdefekte sowohl in der stark methylierten Region des Exon 1A, als auch in der 3' dazu liegenden Promoterregion des *GNAS* Exon 1 vorliegen. Zwar wurden bei drei Zwillingspaaren Methylierungsunterschiede in GNAS1A1 gefunden, jedoch keine Auffälligkeiten in GNAS1A2. Geht man von der Hypothese aus, dass eine Repression von Exon 1A zu einer Derepression des *GNAS* Exon 1-Promoters führt (s. 4.3.3), wäre eine schwächere Methylierung in den Zwillingspaaren 4,5 und 6 gegenüber ihren gesunden Geschwistern zu erwarten. Dies ist nicht der Fall. Das spricht ebenfalls dafür, dass den gefundenen Differenzen in GNAS1A1 kein pathologischer Wert zuzuschreiben ist.

4.4 Weiteres Vorgehen

Die zentrale Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass ein epigenetischer Defekt auf dem *GNAS*-Gen zu einer Diskordanz bei monozygoten Zwillingen mit Schilddrüsendysgenese führen kann. Dafür wurden zwei Regionen untersucht. Eine der Regionen befindet sich im bereits mit TSH-Resistenzen in Zusammenhang gebrachten Bereich der Exon 1A DMR. Die weitere Region ist im 3' dazu liegenden Promoterbereich des Exon 1 von *GNAS* lokalisiert. In beiden Regionen konnten keine Unterschiede gefunden werden, die die Entstehung der Erkrankung mit einer hohen Wahrscheinlichkeit erklären.

Trotzdem können DNA-Methylierungsdefekte im *GNAS*-Genlocus zu Defekten des Gs-Protein gekoppelten TSH-Rezeptors und somit zu Entwicklungsdefekten der Schilddrüse führen. Es wurde mittels Pyrosequenzierung nur ein kleiner Abschnitt von insgesamt zwanzig CpG-Positionen untersucht. Deshalb ist nicht auszuschließen, dass Methylierungsdefekte in der Promoterregion bei den Zwillingen vorliegen.

In einer 2012 von (Kühnen et al.) veröffentlichten Studie wurden Methylierungsdefekte in *POMC* am Übergang einer stark methylierten Region zu einer schwach methylierten Region beschrieben. Die 3' an die methylierte Exon 1A DMR angrenzende Promoterregion ist schwach methyliert. Es könnte demnach vielversprechend sein, in diesem vulnerablen Übergang nach Methylierungsdifferenzen zwischen den diskordanten Zwillingen zu suchen. Mittels Pyrosequenzierung ist dies jedoch erschwert, da in der Region viele aufeinanderfolgende Thyminbasen vorliegen (s. Abb. 4.1).

Auch weitere Untersuchungen sollten folgen, um die Rolle von *GNAS* bei der Entstehung der angeborenen Schilddrüsenunterfunktion einzuordnen und verstehen zu können. Dabei sollte die Region des Exon 1A und des 3' dazu liegenden Promoterbereiches des Exon 1 möglichst großflächig quantitativ untersucht werden. Sollten dabei Differenzen zwischen den gesunden und monozygoten Zwillingen auftreten, müssen diese ebenfalls in gesunden monozygoten Zwillingen untersucht werden, um zu sehen, ob diese Variabilität auch bei gesunden Zwillingspaaren auftritt. Dies gilt ebenfalls für die Region *GNAS1A1*, in der geringe Unterschiede bei drei Zwillingspaaren gefunden werden konnten. Im Anschluss sollten DNA-Methylierungen von größeren Kohorten an CH-Patienten sowie gesunden Kontrollen untersucht und Differenzen auf Signifikanz geprüft werden. Sollten sich dort signifikante Unterschiede zwischen Gesunden und Erkrankten zeigen, müssten weitere Untersuchungen folgen, um die DNA-Methylierungsdefekte an dieser Position und eine defekte Schilddrüsenentwicklung in Zusammenhang bringen zu können.

Zudem sollte berücksichtigt werden, dass auch Modifikationen anderer Gene für die Pathogenese der Schilddrüsendysgenese in Frage kommen. So zum Beispiel die Kandidatengene *TSHR*, *TTF1*, *TTF2*, *PAX8*, und *GLIS-3* (s. 1.1.3). Auch ein Zusammenspiel von DNA-Methylierungsdefekten unterschiedlicher Genloki wäre vorstellbar. Die DNA der monozygoten Zwillinge sollte also mit epigenomweiten Methoden wie RRBS oder post-bisulfite adaptor Tagging (pBAT) analysiert werden, einer weiteren Methode, die in der Lage ist, die DNA methyloweit zu untersuchen (Smallwood et al., 2014).

Falls mittels dieser Methoden keine klaren Unterschiede in den genannten Kandidatengenomen zu erkennen sein sollten, wären auch Epigenomweite Untersuchungen denkbar. In solchen Studien könnten die DNA-Methylierungen des gesamten Epigenoms von Patienten mit Schilddrüsendysgenese mit denen Schilddrüsengesunder mittels Epigenomweiter Assoziationsstudien (kurz: EWAS) (Xu et al., 2016) verglichen werden. Krankheitsbilder wie Schizophrenie (Montano et al., 2016), Parkinson (Moore et al., 2014) und Psoriasis (Zhou et al., 2016) wurden mittels EWAS bereits untersucht. An fehlerfreien, automatisierten oder besser zugänglichen Methoden, die dies ermöglichen, wird weltweit geforscht. Diese Methoden würden die Suche nach DNA-Methylierungen als Ursache für komplexe Krankheitsbilder stark erleichtern.

4.5 Alternative Erklärungsansätze

Epigenetische Konzepte als molekularpathogenetische Erklärung der Schilddrüsendysgenese kommen in Frage. Es sollten jedoch nicht nur DNA-Methylierungen im Fokus des gesuchten Pathomechanismus stehen.

Nach Wu und Morris (2001) ist Epigenetik das Studium der Genfunktionsänderungen, die keine Veränderungen der DNA-Sequenz beinhalten. Diese Definition ist sehr weitläufig. Allein dadurch wird offenbar, wie groß das Feld ist, das den Pathomechanismus der in der Arbeit untersuchten diskordanten Zwillinge erklären könnte. Es bleibt anzunehmen, dass außer den DNA-Methylierungen viele weitere Faktoren eine Rolle bei der Ausprägung einer Schilddrüsendysgenese spielen können. Alle bekannten epigenetischen Veränderungen führen zu einer Strukturänderung des Chromatins. Es kann entweder in einer aktiven, aufgelockerten Form, dem Euchromatin, oder einer inaktiven, stark zusammengefalteten Form, dem Heterochromatin, vorliegen. Außer der DNA-Methylierung, die ihren Beitrag zu einer Inaktivierung leistet, sind vor allem Histonmodifizierungen dafür bekannt, einen starken Einfluss auf die Chromatinstruktur zu haben. So sind beispielweise Histonacetylierungen mit Euchromatin und deshalb mit einer Genaktivierung (Brownell et al., 1996) assoziiert. Histonmethylierungen an einem der Lysine können entweder mit einer Geninaktivierung (Rea et al., 2000) und somit Heterochromatin oder einer Aktivierung (Bernstein et al., 2006) und Euchromatin in Verbindung gebracht werden. Auch regulatorische RNAs wurden mit einer Änderung der Chromatinstruktur assoziiert (Volpe et al., 2002). Abb. 4.4 gibt einen Überblick über die bis heute bekannten epigenetischen Mechanismen und verdeutlicht die Komplexität der Forschung an Erkrankungen, denen ein Defekt in einem dieser Mechanismen zugeschrieben wird.

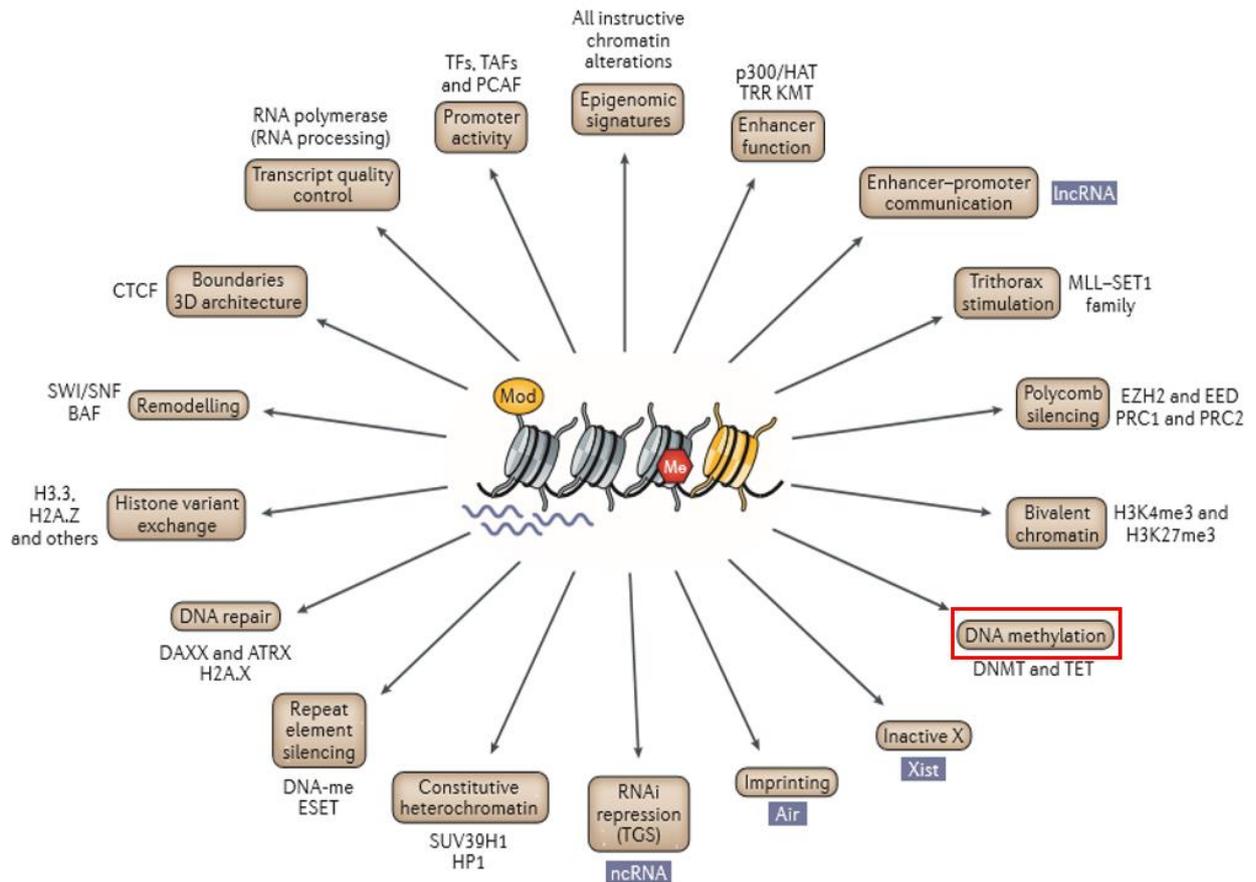


Abb. 4.4: Veranschaulichung der epigenetischen Komplexität nach Allis und Jenuwein (2016):

Da es für einige der Mechanismen keine einheitliche deutsche Übersetzung gibt, wurde die englische Beschriftung des Originals von Allis und Jenuwein genutzt. Im Zentrum der Abbildung ist ein Chromatinfragment mit vier Nucleosomen und den wichtigsten epigenetischen Mechanismen dargestellt: Histonmodifikationen (Mod), DNA-Methylierung (Me), Histonvarianten, Remodelling (gelb) und nichtcodierende RNAs (blaue Wellenlinien). Adaptionen des Chromatins konnten mit zahlreichen Funktionen des Epigenoms in Verbindung gebracht werden (s. Bsp. in Textboxen). Die wichtigsten Chromatinfaktoren, die diese Umwandlung der Chromatinstruktur zur Folge haben, sind mit abgebildet. Die in der Arbeit untersuchte Modifikation ist rot umrandet. **Abkürzungen:** Air: antisense insulin-like growth factor 2 receptor RNA; ATRX: α -thalassemia/mental retardation syndrome X-linked; BAF: BRG1-associated factor; DAXX: death-domain-associated protein; CTCF: CCCTC-binding factor; DNA-me: DNA methylation; DNMT: DNA (cytosine-5)-methyltransferase; EED: embryonic ectoderm development; ESET: ERG-associated protein with SET domain; EZH2: Enhancer of zeste homologue 2; H2A.X: histone H2 variant; H3K4me3: histone H3 lysine 4 trimethylation; HAT: histone acetyltransferase; HP1: heterochromatin protein1; KMT: lysine methyltransferase; lncRNA: long non-coding RNA; MLL: mixed-lineage leukaemia; PCAF: p300/CBP-associated factor; PRC: Polycomb repressive complex; RNAi: RNA-mediated interference; SUV39H1: Su(var)3-9 homologue 1; TAFs: TATA-box binding protein associated factors; TET: ten-eleven translocation; TFs: transcription factors; TGS: transcriptional gene silencing; TRR: Trithorax related; Xist: X-inactive specific transcript.

4.6 Zusammenfassung

Die molekulare Ursache der Schilddrüsendysgenese ist bis heute in der Mehrzahl der Fälle ungeklärt. Das sporadische Auftreten, die regelhafte Diskordanz von monozygoten Zwillingen mit der Erkrankung und die Unabhängigkeit von jahreszeitlichen Schwankungen zeigen, dass der Schilddrüsendysgenese zu großer Wahrscheinlichkeit epigenetische Mechanismen zugrunde liegen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fragestellung bearbeitet, ob die Diskordanz von monozygoten Zwillingen mit Schilddrüsendysgenese durch Methylierungsdifferenzen des *GNAS*-Gens an zwei ausgewählten Regionen erklärt werden kann. Diese Frage konnte mit den vorliegenden Ergebnissen nicht geklärt werden. *GNAS* bleibt jedoch zusammen mit *TSHR*, *TTF1*, *TTF2*, *PAX8*, und *GLIS-3* ein Kandidatengen.

Es wurde darauf hingewiesen, dass vor allem der vulnerable Übergang von Exon 1A des *GNAS*-Gens zur Promoterregion des Exon 1 in weiteren Studien untersucht werden sollte. Methylierungsdefekte an dieser Stelle, aber auch bei einem der weiteren genannten Kandidatengene, sowie ein Zusammenspiel derer könnten möglicherweise eine molekulare Ursache der Schilddrüsendysgenese darstellen.

In der Arbeit wurde auf die Komplexität der epigenetischen Forschung aufmerksam gemacht und ebenso auf die Tatsache, dass nur einer von vielen möglichen epigenetischen Mechanismen untersucht wurde. Es ist wichtig, dass Methoden, die ein genomweites Chromatinprofil erstellen können, automatisiert und leichter zugänglich gemacht werden. Damit könnten die heute bekannten epigenetischen Mechanismen miteinander in Einklang gebracht und die Suche nach unbekanntem Pathomechanismen mit vermutlich epigenetischen Faktoren erleichtert werden.

Auf Grund der regelhaften Diskordanz bei eineiigen Zwillingen spielt die Schilddrüsendysgenese eine wichtige Rolle als Modellerkrankung in der epigenetischen Forschung. Die Klärung ihrer Ursache könnte als Beispiel für andere ungeklärte Pathomechanismen dienen.

5 Literaturverzeichnis

- Akin, M. A., T. Gunes, L. Akin, D. Coban, S. K. Oncu, A. Kiraz, and S. Kurtoglu, 2011, Thyroid hypoplasia as a cause of congenital hypothyroidism in monozygotic twins concordant for Rubinstein-Taybi syndrome: *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, v. 3, p. 32-5.
- Aleksander, P., M. Bruckner-Spieler, A. M. Stohr, E. Lankes, P. Kuhnen, D. Schnabel, A. Ernert, W. Stablein, M. E. Craig, O. Blankenstein, A. Gruters, and H. Krude, 2018, Mean high dose L-thyroxine treatment is efficient and safe to achieve a normal IQ in young adult patients with congenital hypothyroidism: *J Clin Endocrinol Metab*.
- Allis, C. D., and T. Jenuwein, 2016, The molecular hallmarks of epigenetic control, *Nat Rev Genet*, v. 17: England, p. 487-500.
- Alt, B., O. A. Elsalini, P. Schrupf, N. Haufs, N. D. Lawson, G. C. Schwabe, S. Mundlos, A. Grüters, H. Krude, and K. B. Rohr, 2006, Arteries define the position of the thyroid gland during its developmental relocalisation: *Development*, v. 133, p. 3797-804.
- Azam, A., W. Cutfield, F. Mouat, P. L. Hofman, C. Jefferies, D. Webster, and A. J. Gunn, 2012, Missed congenital hypothyroidism in an identical twin: *J Paediatr Child Health*, v. 48, p. 936-8.
- Bastepe, M., 2007, The GNAS Locus: Quintessential Complex Gene Encoding Galpha, XLalphas, and other Imprinted Transcripts: *Curr Genomics*, v. 8, p. 398-414.
- Bastepe, M., L. F. Frohlich, G. N. Hendy, O. S. Indridason, R. G. Josse, H. Koshiyama, J. Korkko, J. M. Nakamoto, A. L. Rosenbloom, A. H. Slyper, T. Sugimoto, A. Tsatsoulis, J. D. Crawford, and H. Juppner, 2003, Autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type 1b is associated with a heterozygous microdeletion that likely disrupts a putative imprinting control element of GNAS: *J Clin Invest*, v. 112, p. 1255-63.
- Bastepe, M., L. S. Weinstein, N. Ogata, H. Kawaguchi, H. Juppner, H. M. Kronenberg, and U. I. Chung, 2004, Stimulatory G protein directly regulates hypertrophic differentiation of growth plate cartilage in vivo: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, p. 14794-9.
- Bernstein, B. E., T. S. Mikkelsen, X. Xie, M. Kamal, D. J. Huebert, J. Cuff, B. Fry, A. Meissner, M. Wernig, K. Plath, R. Jaenisch, A. Wagschal, R. Feil, S. L. Schreiber, and E. S. Lander, 2006, A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells: *Cell*, v. 125, p. 315-26.
- Biebermann, H., T. Schoneberg, H. Krude, G. Schultz, T. Gudermann, and A. Gruters, 1997, Mutations of the human thyrotropin receptor gene causing thyroid hypoplasia and persistent congenital hypothyroidism: *J Clin Endocrinol Metab*, v. 82, p. 3471-80.
- Bird, A. P., 1980, DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA: *Nucleic Acids Res*, v. 8, p. 1499-504.
- Brix, B., R. Werner, P. Staedt, D. Struve, O. Hiort, and S. Thiele, 2014, Different pattern of epigenetic changes of the GNAS gene locus in patients with pseudohypoparathyroidism type 1c confirm the heterogeneity of underlying pathomechanisms in this subgroup of pseudohypoparathyroidism and the demand for a new classification of GNAS-related disorders: *J Clin Endocrinol Metab*, v. 99, p. E1564-70.
- Brownell, J. E., J. Zhou, T. Ranalli, R. Kobayashi, D. G. Edmondson, S. Y. Roth, and C. D. Allis, 1996, Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation: *Cell*, v. 84, p. 843-51.

- Carre, A., A. Stoupa, D. Kariyawasam, M. Gueriouz, C. Ramond, T. Monus, J. Leger, S. Gaujoux, F. Sebag, N. Glaser, D. Zenaty, P. Nitschke, C. Bole-Feysot, L. Hubert, S. Lyonnet, R. Scharfmann, A. Munnich, C. Besmond, W. Taylor, and M. Polak, 2017, Mutations in BOREALIN cause thyroid dysgenesis: *Hum Mol Genet*, v. 26, p. 599-610.
- Castanet, M., D. Marinovic, M. Polak, and J. Leger, 2010, Epidemiology of thyroid dysgenesis: the familial component: *Horm Res Paediatr*, v. 73, p. 231-7.
- Castorina, P., A. Selicorni, F. Bedeschi, L. Dalpra, and L. Larizza, 1997, Genotype-phenotype correlation in two sets of monozygotic twins with Williams syndrome: *Am J Med Genet*, v. 69, p. 107-11.
- Chen, M., J. Wang, K. E. Dickerson, J. Kelleher, T. Xie, D. Gupta, E. W. Lai, K. Pacak, O. Gavrilova, and L. S. Weinstein, 2009, Central nervous system imprinting of the G protein G(s)alpha and its role in metabolic regulation: *Cell Metab*, v. 9, p. 548-55.
- Clark, S. J., J. Harrison, C. L. Paul, and M. Frommer, 1994, High sensitivity mapping of methylated cytosines: *Nucleic Acids Res*, v. 22, p. 2990-7.
- Clark, S. J., A. Statham, C. Stirzaker, P. L. Molloy, and M. Frommer, 2006, DNA methylation: bisulphite modification and analysis: *Nat Protoc*, v. 1, p. 2353-64.
- Clifton-Bligh, R. J., J. M. Wentworth, P. Heinz, M. S. Crisp, R. John, J. H. Lazarus, M. Ludgate, and V. K. Chatterjee, 1998, Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia: *Nat Genet*, v. 19, p. 399-401.
- De Felice, M., C. Ovitt, E. Biffali, A. Rodriguez-Mallon, C. Arra, K. Anastassiadis, P. E. Macchia, M. G. Mattei, A. Mariano, H. Scholer, V. Macchia, and R. Di Lauro, 1998, A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate: *Nat Genet*, v. 19, p. 395-8.
- Deladoey, J., N. Belanger, and G. Van Vliet, 2007, Random variability in congenital hypothyroidism from thyroid dysgenesis over 16 years in Quebec: *J Clin Endocrinol Metab*, v. 92, p. 3158-61.
- Delaney, C., S. K. Garg, and R. Yung, 2015, Analysis of DNA Methylation by Pyrosequencing: *Methods Mol Biol*, v. 1343, p. 249-64.
- Devos, H., C. Rodd, N. Gagne, R. Laframboise, and G. Van Vliet, 1999, A search for the possible molecular mechanisms of thyroid dysgenesis: sex ratios and associated malformations: *J Clin Endocrinol Metab*, v. 84, p. 2502-6.
- Elli, F. M., L. de Sanctis, V. Bollati, L. Tarantini, M. Filopanti, A. M. Barbieri, E. Peverelli, P. Beck-Peccoz, A. Spada, and G. Mantovani, 2014, Quantitative analysis of methylation defects and correlation with clinical characteristics in patients with pseudohypoparathyroidism type I and GNAS epigenetic alterations: *J Clin Endocrinol Metab*, v. 99, p. E508-17.
- Erlich, H. A., 1989, Polymerase chain reaction: *J Clin Immunol*, v. 9, p. 437-47.
- Ferguson-Smith, A. C., 2011, Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm: *Nat Rev Genet*, v. 12, p. 565-75.
- Frommer, M., L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy, and C. L. Paul, 1992, A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 89, p. 1827-31.
- Gardiner-Garden, M., and M. Frommer, 1987, CpG islands in vertebrate genomes: *J Mol Biol*, v. 196, p. 261-82.
- Germain-Lee, E. L., C. L. Ding, Z. Deng, J. L. Crane, M. Saji, M. D. Ringel, and M. A. Levine, 2002, Paternal imprinting of Galpha(s) in the human thyroid as the basis

- of TSH resistance in pseudohypoparathyroidism type 1a: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 296, p. 67-72.
- Grüters, A., H. Biebermann, and H. Krude, 2003, Neonatal thyroid disorders: *Horm Res*, v. 59 Suppl 1, p. 24-9.
- Grüters, A., A. Jenner, and H. Krude, 2002, Long-term consequences of congenital hypothyroidism in the era of screening programmes: *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, v. 16, p. 369-82.
- Grüters, A., and H. Krude, 2011, Detection and treatment of congenital hypothyroidism: *Nature Reviews Endocrinology*, v. 8, p. 104-113.
- Hamm, H. E., 1998, The many faces of G protein signaling: *J Biol Chem*, v. 273, p. 669-72.
- Hayward, B. E., A. Barlier, M. Korbonits, A. B. Grossman, P. Jacquet, A. Enjalbert, and D. T. Bonthon, 2001, Imprinting of the G(s)alpha gene GNAS1 in the pathogenesis of acromegaly: *J Clin Invest*, v. 107, p. R31-6.
- Holliday, R., 2006, Epigenetics: a historical overview: *Epigenetics*, v. 1, p. 76-80.
- Jan de Beur, S., C. Ding, E. Germain-Lee, J. Cho, A. Maret, and M. A. Levine, 2003, Discordance between genetic and epigenetic defects in pseudohypoparathyroidism type 1b revealed by inconsistent loss of maternal imprinting at GNAS1: *Am J Hum Genet*, v. 73, p. 314-22.
- Jorgensen, A. L., J. Philip, W. H. Raskind, M. Matsushita, B. Christensen, V. Dreyer, and A. G. Motulsky, 1992, Different patterns of X inactivation in MZ twins discordant for red-green color-vision deficiency: *Am J Hum Genet*, v. 51, p. 291-8.
- Kelsey, G., 2010, Imprinting on chromosome 20: tissue-specific imprinting and imprinting mutations in the GNAS locus: *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, v. 154c, p. 377-86.
- Kelsey, G., and R. Feil, 2013, New insights into establishment and maintenance of DNA methylation imprints in mammals: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 368, p. 20110336.
- Kimura, S., Y. Hara, T. Pineau, P. Fernandez-Salguero, C. H. Fox, J. M. Ward, and F. J. Gonzalez, 1996, The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary: *Genes Dev*, v. 10, p. 60-9.
- Klenke, S., W. Siffert, and U. H. Frey, 2011, A novel aspect of GNAS imprinting: higher maternal expression of Galphas in human lymphoblasts, peripheral blood mononuclear cells, mammary adipose tissue, and heart: *Mol Cell Endocrinol*, v. 341, p. 63-70.
- Krude, H., B. Schutz, H. Biebermann, A. von Moers, D. Schnabel, H. Neitzel, H. Tonnies, D. Weise, A. Lafferty, S. Schwarz, M. DeFelice, A. von Deimling, F. van Landeghem, R. DiLauro, and A. Grueters, 2002, Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency: *J Clin Invest*, v. 109, p. 475-80.
- Kruyer, H., M. Mila, G. Glover, P. Carbonell, F. Ballesta, and X. Estivill, 1994, Fragile X syndrome and the (CGG)_n mutation: two families with discordant MZ twins: *Am J Hum Genet*, v. 54, p. 437-42.
- Kühnen, P., M. Mischke, S. Wiegand, C. Sers, B. Horsthemke, S. Lau, T. Keil, Y. A. Lee, A. Grueters, and H. Krude, 2012, An Alu element-associated hypermethylation variant of the POMC gene is associated with childhood obesity: *PLoS Genet*, v. 8, p. e1002543.
- Kühnen, P., A. Grueters, and H. Krude, 2009, Two puzzling cases of thyroid dysgenesis: *Horm Res*, v. 71 Suppl 1, p. 93-7.

- Kühnen, P., S. Turan, S. Frohler, T. Guran, S. Abali, H. Biebermann, A. Bereket, A. Gruters, W. Chen, and H. Krude, 2013, Identification of PNDRLN (SLC26A4) mutations in patients with congenital hypothyroidism and "apparent" thyroid dysgenesis: *J Clin Endocrinol Metab*, v. 99, p. E169-76.
- Landis, C. A., S. B. Masters, A. Spada, A. M. Pace, H. R. Bourne, and L. Vallar, 1989, GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours: *Nature*, v. 340, p. 692-6.
- Leger, J., A. Olivieri, M. Donaldson, T. Torresani, H. Krude, G. van Vliet, M. Polak, and G. Butler, 2014, European Society for Paediatric Endocrinology consensus guidelines on screening, diagnosis, and management of congenital hypothyroidism: *J Clin Endocrinol Metab*, v. 99, p. 363-84.
- Lehmann, U., 2008, Quantitative DNA-Methylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung: *BIOspektrum*, v. 14.
- Levine, M. A., R. W. Downs, Jr., M. Singer, S. J. Marx, G. D. Aurbach, and A. M. Spiegel, 1980, Deficient activity of guanine nucleotide regulatory protein in erythrocytes from patients with pseudohypoparathyroidism: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 94, p. 1319-24.
- Lister, R., M. Pelizzola, R. H. Dowen, R. D. Hawkins, G. Hon, J. Tonti-Filippini, J. R. Nery, L. Lee, Z. Ye, Q. M. Ngo, L. Edsall, J. Antosiewicz-Bourget, R. Stewart, V. Ruotti, A. H. Millar, J. A. Thomson, B. Ren, and J. R. Ecker, 2009, Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences: *Nature*, v. 462, p. 315-22.
- Liu, J., B. Erlichman, and L. S. Weinstein, 2003, The stimulatory G protein alpha-subunit Gs alpha is imprinted in human thyroid glands: implications for thyroid function in pseudohypoparathyroidism types 1A and 1B: *J Clin Endocrinol Metab*, v. 88, p. 4336-41.
- Liu, J., D. Litman, M. J. Rosenberg, S. Yu, L. G. Biesecker, and L. S. Weinstein, 2000, A GNAS1 imprinting defect in pseudohypoparathyroidism type 1B: *J Clin Invest*, v. 106, p. 1167-74.
- Lorey, F. W., and G. C. Cunningham, 1992, Birth prevalence of primary congenital hypothyroidism by sex and ethnicity: *Hum Biol*, v. 64, p. 531-8.
- Macchia, P. E., P. Lapi, H. Krude, M. T. Pirro, C. Missero, L. Chiovato, A. Souabni, M. Baserga, V. Tassi, A. Pinchera, G. Fenzi, A. Gruters, M. Busslinger, and R. Di Lauro, 1998, PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis: *Nat Genet*, v. 19, p. 83-6.
- Mansouri, A., K. Chowdhury, and P. Gruss, 1998, Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function: *Nat Genet*, v. 19, p. 87-90.
- Mantovani, G., S. Bondioni, A. Linglart, M. Maghnie, M. Cisternino, S. Corbetta, A. G. Lania, P. Beck-Peccoz, and A. Spada, 2007, Genetic analysis and evaluation of resistance to thyrotropin and growth hormone-releasing hormone in pseudohypoparathyroidism type 1b: *J Clin Endocrinol Metab*, v. 92, p. 3738-42.
- Mantovani, G., S. Bondioni, M. Locatelli, C. Pedroni, A. G. Lania, E. Ferrante, M. Filopanti, P. Beck-Peccoz, and A. Spada, 2004, Biallelic expression of the Gsalpha gene in human bone and adipose tissue: *J Clin Endocrinol Metab*, v. 89, p. 6316-9.
- Mashayekhi, F., and M. Ronaghi, 2007, Analysis of read length limiting factors in Pyrosequencing chemistry: *Anal Biochem*, v. 363, p. 275-87.
- Maupetit-Mehouas, S., V. Mariot, C. Reynes, G. Bertrand, F. Feillet, J. C. Carel, D. Simon, H. Bihan, V. Gajdos, E. Devouge, S. Shenoy, P. Agbo-Kpati, A. Ronan, C. Naud-Saudreau, A. Lienhardt, C. Silve, and A. Linglart, 2011, Quantification of the

- methylation at the GNAS locus identifies subtypes of sporadic pseudohypoparathyroidism type Ib: *J Med Genet*, v. 48, p. 55-63.
- Mayer, W., A. Niveleau, J. Walter, R. Fundele, and T. Haaf, 2000, Demethylation of the zygotic paternal genome: *Nature*, v. 403, p. 501-2.
- McLean, R., N. Howard, and I. P. Murray, 1985, Thyroid dysgenesis in monozygotic twins: variants identified by scintigraphy: *Eur J Nucl Med*, v. 10, p. 346-8.
- Montano, C., M. A. Taub, A. Jaffe, E. Briem, J. I. Feinberg, R. Trygvadottir, A. Idrizi, A. Runarsson, B. Berndsen, R. C. Gur, T. M. Moore, R. T. Perry, D. Fugman, S. Sabunciyani, R. H. Yolken, T. M. Hyde, J. E. Kleinman, J. L. Sobell, C. N. Pato, M. T. Pato, R. C. Go, V. Nimgaonkar, D. R. Weinberger, D. Braff, R. E. Gur, M. D. Fallin, and A. P. Feinberg, 2016, Association of DNA Methylation Differences With Schizophrenia in an Epigenome-Wide Association Study: *JAMA Psychiatry*, v. 73, p. 506-14.
- Moore, K., A. J. McKnight, D. Craig, and F. O'Neill, 2014, Epigenome-wide association study for Parkinson's disease: *Neuromolecular Med*, v. 16, p. 845-55.
- Myers, R., ENCODE project UCSC.
- Nguyen, L. Q., P. Kopp, F. Martinson, K. Stanfield, S. I. Roth, and J. L. Jameson, 2000, A dominant negative CREB (cAMP response element-binding protein) isoform inhibits thyrocyte growth, thyroid-specific gene expression, differentiation, and function: *Mol Endocrinol*, v. 14, p. 1448-61.
- Nieuwint, A., R. Van Zalen-Sprock, P. Hummel, G. Pals, J. Van Vugt, H. Van Der Harten, Y. Heins, and K. Madan, 1999, 'Identical' twins with discordant karyotypes: *Prenat Diagn*, v. 19, p. 72-6.
- Oates, N. A., J. van Vliet, D. L. Duffy, H. Y. Kroes, N. G. Martin, D. I. Boomsma, M. Campbell, M. G. Coulthard, E. Whitelaw, and S. Chong, 2006, Increased DNA methylation at the AXIN1 gene in a monozygotic twin from a pair discordant for a caudal duplication anomaly: *Am J Hum Genet*, v. 79, p. 155-62.
- Patten, J. L., D. R. Johns, D. Valle, C. Eil, P. A. Gruppuso, G. Steele, P. M. Smallwood, and M. A. Levine, 1990, Mutation in the gene encoding the stimulatory G protein of adenylate cyclase in Albright's hereditary osteodystrophy: *N Engl J Med*, v. 322, p. 1412-9.
- Perry, R., C. Heinrichs, P. Bourdoux, K. Khoury, F. Szots, J. H. Dussault, G. Vassart, and G. Van Vliet, 2002, Discordance of monozygotic twins for thyroid dysgenesis: implications for screening and for molecular pathophysiology: *J Clin Endocrinol Metab*, v. 87, p. 4072-7.
- Plagge, A., G. Kelsey, and E. L. Germain-Lee, 2008, Physiological functions of the imprinted Gnas locus and its protein variants Galpha(s) and XLalpha(s) in human and mouse: *J Endocrinol*, v. 196, p. 193-214.
- Razin, A., and A. D. Riggs, 1980, DNA methylation and gene function: *Science*, v. 210, p. 604-10.
- Rea, S., F. Eisenhaber, D. O'Carroll, B. D. Strahl, Z. W. Sun, M. Schmid, S. Opravil, K. Mechtler, C. P. Ponting, C. D. Allis, and T. Jenuwein, 2000, Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases: *Nature*, v. 406, p. 593-9.
- Reik, W., W. Dean, and J. Walter, 2001, Epigenetic reprogramming in mammalian development: *Science*, v. 293, p. 1089-93.
- Romanet, P., L. Osei, I. Netchine, M. Pertuit, A. Enjalbert, R. Reynaud, and A. Barlier, 2015, Case report of GNAS epigenetic defect revealed by a congenital hypothyroidism: *Pediatrics*, v. 135, p. e1079-83.

- Senee, V., C. Chelala, S. Duchatelet, D. Feng, H. Blanc, J. C. Cossec, C. Charon, M. Nicolino, P. Boileau, D. R. Cavener, P. Bougneres, D. Taha, and C. Julier, 2006, Mutations in GLIS3 are responsible for a rare syndrome with neonatal diabetes mellitus and congenital hypothyroidism: *Nat Genet*, v. 38, p. 682-7.
- Shotelersuk, V., C. J. Tifft, S. Vacha, K. F. Peters, and L. G. Biesecker, 1999, Discordance of oral-facial-digital syndrome type 1 in monozygotic twin girls: *Am J Med Genet*, v. 86, p. 269-73.
- Silva, S., Y. Martins, A. Matias, and I. Blickstein, 2011, Why are monozygotic twins different?: *J Perinat Med*, v. 39, p. 195-202.
- Smallwood, S. A., H. J. Lee, C. Angermueller, F. Krueger, H. Saadeh, J. Peat, S. R. Andrews, O. Stegle, W. Reik, and G. Kelsey, 2014, Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity: *Nat Methods*, v. 11, p. 817-20.
- Stein, S. A., E. L. Oates, C. R. Hall, R. M. Grumbles, L. M. Fernandez, N. A. Taylor, D. Puett, and S. Jin, 1994, Identification of a point mutation in the thyrotropin receptor of the *hyt/hyt* hypothyroid mouse: *Mol Endocrinol*, v. 8, p. 129-38.
- Tafaj, O., and H. Juppner, 2017, Pseudohypoparathyroidism: one gene, several syndromes: *J Endocrinol Invest*, v. 40, p. 347-356.
- The University of Hong Kong, 2015, Centre for Genomic Sciences.
- Thiele, S., L. de Sanctis, R. Werner, J. Grotzinger, C. Aydin, H. Juppner, M. Bastepe, and O. Hiort, 2011, Functional characterization of GNAS mutations found in patients with pseudohypoparathyroidism type 1c defines a new subgroup of pseudohypoparathyroidism affecting selectively Gs α -receptor interaction: *Hum Mutat*, v. 32, p. 653-60.
- Tiberio, G., 1994, MZ female twins discordant for X-linked diseases: a review: *Acta Genet Med Gemellol (Roma)*, v. 43, p. 207-14.
- Tufarelli, C., J. A. Stanley, D. Garrick, J. A. Sharpe, H. Ayyub, W. G. Wood, and D. R. Higgs, 2003, Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease: *Nat Genet*, v. 34, p. 157-65.
- Volpe, T. A., C. Kidner, I. M. Hall, G. Teng, S. I. Grewal, and R. A. Martienssen, 2002, Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi: *Science*, v. 297, p. 1833-7.
- Wan, L. B., and M. S. Bartolomei, 2008, Regulation of imprinting in clusters: noncoding RNAs versus insulators: *Adv Genet*, v. 61, p. 207-23.
- Warkany, J., and T. K. Selkirk, 1955, Discordant monozygotic twins; hypothyroidism: *AMA Am J Dis Child*, v. 89, p. 144-8.
- Weinstein, L. S., P. V. Gejman, E. Friedman, T. Kadowaki, R. M. Collins, E. S. Gershon, and A. M. Spiegel, 1990, Mutations of the Gs α -subunit gene in Albright hereditary osteodystrophy detected by denaturing gradient gel electrophoresis: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 87, p. 8287-90.
- Weinstein, L. S., A. Shenker, P. V. Gejman, M. J. Merino, E. Friedman, and A. M. Spiegel, 1991, Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome: *N Engl J Med*, v. 325, p. 1688-95.
- Weinstein, L. S., S. Yu, D. R. Warner, and J. Liu, 2001, Endocrine manifestations of stimulatory G protein α -subunit mutations and the role of genomic imprinting: *Endocr Rev*, v. 22, p. 675-705.
- Weksberg, R., C. Shuman, O. Caluseriu, A. C. Smith, Y. L. Fei, J. Nishikawa, T. L. Stockley, L. Best, D. Chitayat, A. Olney, E. Ives, A. Schneider, T. H. Bestor, M. Li, P. Sadowski, and J. Squire, 2002, Discordant KCNQ1OT1 imprinting in sets of

- monozygotic twins discordant for Beckwith-Wiedemann syndrome: *Hum Mol Genet*, v. 11, p. 1317-25.
- Williamson, C. M., S. T. Ball, W. T. Nottingham, J. A. Skinner, A. Plagge, M. D. Turner, N. Powles, T. Hough, D. Papworth, W. D. Fraser, M. Maconochie, and J. Peters, 2004, A cis-acting control region is required exclusively for the tissue-specific imprinting of *Gnas*: *Nat Genet*, v. 36, p. 894-9.
- Wu, C., and J. R. Morris, 2001, Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence, *Science*, v. 293: United States, p. 1103-5.
- Xu, J., D. Liu, L. Zhao, Y. Li, Z. Wang, Y. Chen, C. Lei, L. Gao, F. Kong, L. Yuan, and Y. Jiang, 2016, EWAS: epigenome-wide association studies software 1.0 - identifying the association between combinations of methylation levels and diseases: *Sci Rep*, v. 6, p. 37951.
- Yu, S., D. Yu, E. Lee, M. Eckhaus, R. Lee, Z. Corria, D. Accili, H. Westphal, and L. S. Weinstein, 1998, Variable and tissue-specific hormone resistance in heterotrimeric Gs protein alpha-subunit (*Gsalpha*) knockout mice is due to tissue-specific imprinting of the *gsalpha* gene: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, p. 8715-20.
- Zhou, F., W. Wang, C. Shen, H. Li, X. Zuo, X. Zheng, M. Yue, C. Zhang, L. Yu, M. Chen, C. Zhu, X. Yin, M. Tang, Y. Li, G. Chen, Z. Wang, S. Liu, Y. Zhou, F. Zhang, W. Zhang, C. Li, S. Yang, L. Sun, and X. Zhang, 2016, Epigenome-Wide Association Analysis Identified Nine Skin DNA Methylation Loci for Psoriasis: *J Invest Dermatol*, v. 136, p. 779-87.
- Zneimer, S. M., N. R. Schneider, and C. S. Richards, 1993, In situ hybridization shows direct evidence of skewed X inactivation in one of monozygotic twin females manifesting Duchenne muscular dystrophy: *Am J Med Genet*, v. 45, p. 601-5.

6 Eidesstaatliche Versicherung

„Ich, Vera Thormeyer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Analyse der DNA-Methylierung des *GNAS*-Gens bei diskordanten, monozygoten Zwillingen mit kongenitaler Hypothyreose“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

7 Curriculum vitae

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

8 Danksagung

Ich möchte mich bei Dr. Peter Kühnen bedanken, der mir die Durchführung meiner Dissertation am Institut für experimentelle pädiatrische Endokrinologie ermöglicht hat und mich mit seiner positiven und motivierenden Art eingeführt hat in die komplexe Welt der Epigenetik und des experimentellen Arbeitens.

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Heiko Krude, der meine Arbeit betreut hat und in unseren Treffen mein Interesse für die experimentelle endokrinologische Forschung immer weiter intensivieren konnte.

Ich danke sowohl der gesamten Arbeitsgruppe Prof. Dr. Heiko Krudes als auch der Arbeitsgruppe von PD Dr. Heike Biebermann. Alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter haben in „Journal Clubs“ oder Präsentationen der eigenen Arbeit interessante Denksätze geben können, von denen ich sehr profitieren konnte. Besonderer Dank gilt Lena Walzer und Daniela Handke, die mich in die Methodik der Pyrosequenzierung eingearbeitet haben, sowie Rita Oeltjen und Agnes Rudolf, die mit ihrer langjährigen Laborerfahrung stets neue Ideen für die Etablierung der Methoden hatten.

Ich danke meinen Eltern Annette Wilmes und Hans-Heinrich Thormeyer ganz besonders für ihre Unterstützung und im Speziellen meinem Bruder Simon Thormeyer sowie meiner Mutter für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich danke meinem Lebenspartner Philipp Lorscheidt, der mit mir durch alle Höhen und Tiefen beim Erstellen dieser Arbeit gegangen ist.

Natürlich gilt mein Dank auch meinen Freundinnen und Freunden, ohne deren Unterstützung ich nicht in der Lage gewesen wäre diese Arbeit zu schreiben.