

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

DISSERTATION

Untersuchung der Stabilität der DNA-Methylierung des *POMC*-  
Gens mittels Pyrosequenzierung von DNA aus  
Neugeborenenenscreeningkarten und EDTA-Blutproben

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lena Walzer

aus Berlin

**Datum der Promotion: 13.12.2019**

**Teile dieser Dissertation wurden bereits in folgendem Artikel veröffentlicht:**

Kühnen P, Handke D, Waterland Robert A, Hennig Branwen J, Silver M, Fulford Anthony J, Dominguez-Salas P, Moore Sophie E, Prentice Andrew M, Spranger J, Hinney A, Hebebrand J, Heppner Frank L, **Walzer L**, Grötzinger C, Gromoll J, Wiegand S, Grüters A, and Krude H, *Interindividual Variation in DNA Methylation at a Putative POMC Metastable Epiallele Is Associated with Obesity*. Cell Metabolism, 2016. **24**(3): p. 502-9.

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1. Das Krankheitsbild Adipositas</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2. Die Regulation des Körpergewichts</b> .....	<b>7</b>
1.2.1. Interindividuelle Variabilität des Körpergewichts.....	7
1.2.2. Einfluss der Genetik auf die Körpergewichtsregulation.....	8
1.2.2.1. Identifikation des ersten Gens der Körpergewichtsregulation.....	8
1.2.3. Der Leptin-Melanocortin-Signalweg.....	8
<b>1.3. Genetische Faktoren der Körpergewichtsregulation</b> .....	<b>10</b>
1.3.1. Monogenetische Ursachen der Adipositas.....	10
1.3.2. Genomweite Assoziationsstudien.....	10
1.3.3. „Missing heritability“.....	11
<b>1.4. Epigenetik</b> .....	<b>12</b>
1.4.1. DNA-Methylierung.....	12
1.4.1.1. Entstehung und Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung.....	13
1.4.1.2. DNA-Methylierung im Rahmen von genomischen Imprinting.....	14
1.4.1.3. Variabilität und Stabilität der DNA-Methylierung.....	15
<b>1.5. Epigenetik als dynamischer Prozess</b> .....	<b>15</b>
1.5.1. Studien an Erwachsenen.....	15
1.5.2. Studien im Kindesalter.....	16
<b>1.6. Epigenetische Stabilität</b> .....	<b>17</b>
1.6.1. Metastabile Epiallele als Beispiel für epigenetische Stabilität.....	17
1.6.1.1. Humane metastabile Epiallele und der Einfluss periconceptioneller Nährstoffzufuhr.....	18
1.6.1.2. Der Einfluss von periconceptioneller Nährstoffzufuhr auf das Epigenom am Beispiel „Dutch Hunger Winter“.....	18
1.6.2. Epigenetische Stabilität außerhalb von metastabilen Epiallelen.....	19
<b>1.7. Epigenetik und die Regulation des Körpergewichts</b> .....	<b>20</b>
1.7.1. Epigenetische Kandidatengenstudie am <i>POMC</i> -Gen.....	20
<b>2. Fragestellung dieser Arbeit</b> .....	<b>22</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1. Material</b> .....	<b>24</b>
3.1.1. Probanden.....	24
3.1.2. Primer.....	24
3.1.3. Kits.....	25
3.1.4. Chemikalien, Lösungen und Puffer.....	25
3.1.5. Geräte.....	26
<b>3.2. Methoden</b> .....	<b>26</b>
3.2.1. Richtlinien.....	26
3.2.2. DNA-Extraktion.....	26
3.2.3. DNA-Quantifikation.....	27
3.2.4. Bisulfitumwandlung.....	27
3.2.5. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	28
3.2.5.1. PCR <i>GNASAS</i> .....	29
3.2.5.2. PCR <i>POMC</i> Intron2/Exon3-Übergang.....	29
3.2.6. Gelelektrophorese.....	30
3.2.7. Aufreinigung der PCR mit magnetischen Beads.....	31
3.2.8. Pyrosequenzierung.....	31
3.2.8.1. Pyrosequenzierung am <i>GNASAS</i> - und <i>POMC</i> -Locus.....	35
<b>3.3. Statistische Auswertung</b> .....	<b>35</b>
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1. Probanden</b> .....	<b>37</b>

4.1.1. Probanden des <i>GNASAS</i> -Locus .....	37
4.1.2. Probanden des <i>POMC</i> Intron2/Exon3-Übergangs .....	38
<b>4.2. Etablierung einer Pyrosequenzierung für DNA extrahiert aus einer Neugeborenencreeningkarte .....</b>	<b>40</b>
4.2.1. DNA-Extraktion aus Trockenblut und Einsatz dieser für eine Bisulfit-PCR .....	40
4.2.2. Vergleichbarkeit der Materialien Trockenblut und EDTA-Blut .....	41
<b>4.3. DNA-Extraktion, PCR und Pyrosequenzierung der untersuchten Probanden .....</b>	<b>42</b>
4.3.1. DNA-Extraktion und Polymerasekettenreaktion der untersuchten Probanden .....	42
4.3.2. Pyrosequenzierung der DNA gewonnen aus Trockenblut und EDTA-Blut .....	43
<b>4.4. Überprüfung der Stabilität der DNA-Methylierung am <i>GNASAS</i>-Locus .....</b>	<b>44</b>
4.4.1. Stabilitätsanalyse anhand der durchschnittlichen DNA-Methylierung .....	44
4.4.2. Überprüfung der individuellen Stabilität am <i>GNASAS</i> -Locus .....	45
<b>4.5. Untersuchung der Stabilität am <i>POMC</i> Intron2/Exon3-Übergang .....</b>	<b>46</b>
4.5.1. Pyrosequenzierung des <i>POMC</i> Intron2/Exon3-Übergangs .....	46
4.5.2. Stabilitätsanalyse des gesamten Abschnittes des <i>POMC</i> -Locus .....	48
4.5.2.1. Stabilitätsanalyse anhand der durchschnittlichen DNA-Methylierung .....	48
4.5.2.2. Untersuchung der individuellen Stabilität am <i>POMC</i> -Locus .....	49
4.5.3. Überprüfung der individuellen Stabilität an den einzelnen CpG-Positionen .....	49
<b>4.6. Assoziation zwischen der DNA-Methylierung und dem BMI-SDS .....</b>	<b>52</b>
<b>4.7. Einfluss des Alters auf die DNA-Methylierung .....</b>	<b>53</b>
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>54</b>
5.1. Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse .....	54
<b>5.2. Bezug der Ergebnisse auf die Frage nach einem potentiellen metastabilen Epiallel am <i>POMC</i>-Locus .....</b>	<b>58</b>
<b>5.3. Ergebnisse im aktuellen Vergleich .....</b>	<b>59</b>
5.3.1. Vergleich mit longitudinalen Studien mit Beginn bei Geburt .....	59
5.3.2. Vergleich der Ergebnisse mit longitudinalen Studien mit variablen Beginn .....	63
5.3.3. Vergleich zu Querschnittsstudien .....	64
<b>5.4. Limitationen der Arbeit .....</b>	<b>65</b>
<b>5.5. Vorteile der Arbeit .....</b>	<b>67</b>
<b>5.6. Schlussfolgerung und Ausblick .....</b>	<b>68</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>70</b>
<b>7. Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>79</b>
<b>8. Tabellarischer Lebenslauf .....</b>	<b>81</b>
<b>9. Publikationsliste .....</b>	<b>82</b>
<b>10. Danksagung .....</b>	<b>83</b>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: DNA-Sequenzen der verwendeten PCR-und Sequenzierungs-Primer .....	24
Tabelle 2: Verwendete Kits.....	25
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien, Lösungen und Puffer.....	25
Tabelle 4: Verwendete Geräte.....	26
Tabelle 5: PCR-Ansatz für den <i>GNASAS</i> -Locus .....	29
Tabelle 6: PCR-Ansatz für den <i>POMC</i> Intron2/Exon3-Übergang.....	30
Tabelle 7: Überblick über die untersuchten Probanden des <i>GNASAS</i> -Locus .....	38
Tabelle 8: Überblick über die Probandendes <i>POMC</i> -Locus.....	38
Tabelle 9: Vergleichbarkeit der DNA-Methylierung bei Betrachtung der verwendeten Materialien: Trockenblut der Neugeborenenenscreeningkarte und EDTA-Blut .....	41
Tabelle 10: Übersicht Geburtskohortenstudien zur Stabilität der DNA-Methylierung...	62
Tabelle 11: Überblick über longitudinale Studien zur Stabilität der DNA-Methylierung mit einem Beobachtungszeitraum im späteren Leben .....	64

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Perzentilkurven für den BMI für Jungen.....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Leptin-Melanocortin-Signalwegs.....	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung der DNA-Methylierung .....	12
Abbildung 4: DNA-Methylierung der Keimzellen .....	14
Abbildung 5: Hypermethylierung im Exon 3 des <i>POMC</i> -Gens .....	21
Abbildung 6: Darstellung der Deaminierung des Cytosins zu Uracil .....	28
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Pyrosequenzierung I .....	32
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Pyrosequenzierung II .....	33
Abbildung 9 : Schematische Darstellung eines Pyrogramms .....	33
Abbildung 10: Abbau der dNTPs .....	34
Abbildung 11: Beispiel einer Neugeborenenenscreeningkart.....	40
Abbildung 12: Beispiel einer Gelelektrophorese .....	42
Abbildung 13: Pyrogramme des <i>GNASAS</i> -Locus .....	43
Abbildung 14: : Whiskers-Boxplot der durchschnittlichen Methylierung des <i>GNASAS</i> -Locus .....	45
Abbildung 15: Korrelation der durchschnittlichen DNA-Methylierung zum Zeitpunkt des Neugeborenenenscreenings mit der durchschnittlichen DNA-Methylierung zum Zeitpunkt der EDTA-Blutentnahme für den <i>GNASAS</i> -Locus.....	46
Abbildung 16: Pyrogramme des <i>POMC</i> -Locus.....	47
Abbildung 17: Whiskers-Boxplot der durchschnittlichen Methylierung des <i>POMC</i> -Locus .....	48
Abbildung 18: Korrelation der durchschnittlichen DNA-Methylierung zum Zeitpunkt des Neugeborenenenscreenings mit der durchschnittlichen DNA-Methylierung zum Zeitpunkt der EDTA-Blutentnahme für den <i>POMC</i> -Locus .....	49
Abbildung 19: Korrelation der DNA-Methylierung für die CpG-Positionen -2,-1,1 und 250	
Abbildung 20: Korrelation der DNA-Methylierung für die CpG-Positionen 3, 4 und 5.....	51
Abbildung 21: Korrelation des BMI-SDS mit der durchschnittlichen Methylierung der stabilen CpG-Positionen -2,-1,1 und 4 zum Zeitpunkt des Neugeborenenenscreenings .....	52
Abbildung 22: Korrelation des Alters bei EDTA-Blutentnahme mit der durchschnittlichen Methylierung von CpG-Position -2 bis 5 .....	53



## Zusammenfassung

**Hintergrund:** In Zwillings- und Familienstudien zeigte sich eine hohe Heritabilität von Übergewicht und Adipositas. Dabei konnte die molekulare Ursache trotz umfangreicher monogenetischer Untersuchungen und genomweiter Assoziationsstudien nur unzureichend erklärt werden. Aus diesem Grunde wird untersucht, in wie weit epigenetische Modifikationen eine Rolle in der Körpergewichtsregulation spielen. Insbesondere die DNA-Methylierung, welche die Genexpression beeinflussen kann, wird dabei betrachtet. In einer Kandidatengenstudie am *POMC*-Gen konnte eine Assoziation von Übergewicht/Adipositas und einer vermehrten DNA-Methylierung am Intron2/Exon3-Übergang des *POMC*-Gens gezeigt werden. Da es nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich die DNA-Methylierung postnatal verändert, stellt sich die Frage, ob diese *POMC*-Variante primär besteht oder als Folge der Adipositas sekundär postnatal entstanden ist.

**Ziel der Arbeit:** Die epigenetische Stabilität des Intron2/Exon3-Übergangs des *POMC*-Gens sollte postnatal von Geburt bis ins spätere Kindes- oder Jugendalter untersucht werden. Dazu sollte zunächst die Etablierung der Pyrosequenzierung von DNA, die aus dem Trockenblut einer U2-Neugeborenencreeningkarte gewonnen wurde, erfolgen.

**Methoden:** Es erfolgte die Analyse der DNA-Methylierung mittels Pyrosequenzierung von Bisulfit-umgewandelter DNA gewonnen aus Neugeborenencreeningkarten sowie EDTA-Blut, das in späterer Kindheit oder Jugend abgenommen worden war. Zur Validierung der Methodik wurde der imprintete *GNASAS*-Locus im Exon 1 untersucht. Am *POMC*-Locus wurden die CpG-Positionen des Intron2/Exon3-Übergangs analysiert.

**Ergebnisse:** Die DNA-Methylierung von DNA gewonnen aus dem Trockenblut einer Neugeborenencreeningkarte kann valide mittels Pyrosequenzierung analysiert werden. Die Methodik konnte anhand der Untersuchung des imprinteten *GNASAS*-Locus validiert werden. Dort zeigte sich an 35 Probanden eine hohe Korrelation der DNA-Methylierung der beiden untersuchten Zeitpunkte (durchschnittliches Alter bei EDTA-Blutentnahme 9,9 Jahre), was auf eine Stabilität der DNA-Methylierung in der untersuchten Region hindeutet. Die DNA-Methylierung des *POMC* Intron2/Exon3-Übergangs zeigte in Proben von 55 Probanden ebenfalls eine hohe Korrelation zwischen der Blutentnahme kurzzeitig nach Geburt und der im weiteren Verlauf des Lebens (durchschnittliches Alter bei EDTA-Blutentnahme 11,4 Jahre), was auf hohe Stabilität in der untersuchten Region hindeutet.

### **Schlussfolgerung:**

Im Rahmen dieser Dissertation wurde gezeigt, dass die Neugeborenencreeningkarte eingesetzt werden kann, um die Stabilität der DNA-Methylierung von Geburt bis ins spätere Leben zu untersuchen. Durch diese Methodik konnte der Beobachtungszeitraum der DNA-Methylierung im Vergleich zu bisherigen Geburtskohortenstudien signifikant erweitert werden.

Die Erkenntnis, dass sich die DNA-Methylierung am *POMC* Intron2/Exon3-Übergang stabil darstellt, spielt eine entscheidende Rolle in der Identifikation des *POMC*-Gens als potentiell humanes metastabiles Epiallel.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die *POMC*-Methylierungsvariante von Geburt an besteht und gegebenenfalls kausal ein Risikofaktor für die Adipositasentwicklung ist und nicht als Folge dieser angesehen werden kann.



## Abstract

**Background:** Previously, the genetic variants found in genome-wide association studies and monogenic studies could only explain the high heritability of overweight and obesity as found in family and twin studies to a little extent. This then led to the investigation of epigenetic modifications in the context of body weight regulation, in particular DNA methylation, which might affect gene expression. A candidate gene study of the *POMC* gene showed an association between obesity and increased DNA methylation of the *POMC* intron2/exon3-locus. It cannot be ruled out that DNA methylation changes over the course of life. The question remains as to whether this *POMC*-variant occurred postnatal as a consequence of obesity or was already present at birth.

**Aim of study:** The aim of the study was to discover whether the *POMC* intron2/exon3-locus is epigenetic stable postnatal from birth until later childhood/adolescence or not. The pyrosequencing of DNA extracted from a newborn blood spot test needed to be established first.

**Methods:** Pyrosequencing of bisulfite-treated DNA extracted from newborn blood spot tests and DNA extracted from EDTA blood samples collected later in life was conducted for DNA methylation analysis. As validation of the method exon 1 of the imprinted *GNASAS* gene was analyzed. CpG-Positions of the intron2/exon3-locus were analyzed for the *POMC* gene.

**Results:** It was shown that DNA methylation could be validly analyzed by pyrosequencing DNA extracted from a newborn blood spot test. By showing DNA methylation stability at the imprinted *GNASAS*-locus, the method could be validated. For the *GNASAS*-locus in 35 subjects, there was a high correlation of the DNA methylation at the two analyzed points in time (mean age for EDTA blood sampling 9,9 years). Within the *POMC* intron2/exon3-locus in 55 subjects, there was also a high correlation of the DNA methylation at the two analyzed points in time (mean age for EDTA blood sampling 11,4 years), which indicates DNA methylation stability.

**Conclusion:** It was shown that the newborn blood spot test can be utilized to analyze DNA methylation stability from birth until later life. With this method, the observation period of DNA methylation could be significantly extended compared to previous birth cohort studies.

The finding of epigenetic stability of the *POMC* intron2/Exon3-locus is essential for its identification as a potential human metastable epiallele.

The presence of the *POMC*-variant at birth implies that the methylation difference is not a consequence of obesity but could rather be a causative risk factor.

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Krankheitsbild Adipositas

Die Adipositas hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einem globalen gesundheitlichen Problem entwickelt. Laut Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat sich weltweit die Zahl der Adipösen seit 1980 mehr als verdoppelt. Im Jahre 2014 waren mehr als 1,9 Milliarden Erwachsene übergewichtig, davon 650 Millionen adipös. Bei den unter 18-jährigen waren 39% übergewichtig, davon 13% sogar adipös [1]. Im Jahr 2010 waren Übergewicht und Adipositas schätzungsweise für 3,4 Millionen Todesfälle weltweit verantwortlich [2]. Übergewicht ist nicht mehr nur ein Problem der Industriestaaten, sondern zunehmend auch der Entwicklungs- und Schwellenländer [3]. Das große gesundheitliche Risiko besteht vor allem durch die Folgeerkrankungen des Übergewichts. Dazu zählen eine gestörte Glukosetoleranz, ein Diabetes Mellitus Typ 2, eine Dyslipidämie, ein arterieller Hypertonus, eine Nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung (NAFLD) und Steatohepatitis (NASH) sowie orthopädische oder psychosoziale Probleme [4, 5]. Auch wirtschaftlich betrachtet sind die Adipositas und die assoziierten Komorbiditäten eine große Herausforderung. Allein in Deutschland entstehen pro Jahr Kosten von schätzungsweise 63 Milliarden Euro [6].

In der von 2008 bis 2011 durchgeführten „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland“ (DEGS1-Studie) des Robert-Koch-Instituts wurde gezeigt, dass in Deutschland 67,1% der Männer und 53,0% der Frauen übergewichtig sind. 23,3% der Männer und 23,9% der Frauen sind adipös [7]. In der „Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland“ (KiGGS-Studie) des Robert-Koch-Instituts aus dem Jahr 2007 wurde gezeigt, dass Übergewicht und Adipositas in Deutschland bereits im Kindesalter ein großes Problem darstellen. Insgesamt sind 15% der Kinder und Jugendlichen im Alter von 3-17 Jahren übergewichtig und 6,3% adipös [8].

Übergewicht und Adipositas entstehen sobald die Energiezufuhr längerfristig größer ist als der Energieaufwand. Ursachen davon können Lifestyle- und Umweltfaktoren wie zum Beispiel Bewegungsmangel, Fehlernährung, ständige Verfügbarkeit von Nahrung oder Stress sein. Auch eine genetische Prädisposition, endokrinologische Erkrankungen, Essstörungen, depressive Erkrankung, ein niedriger sozioökonomischer Status oder Medikamenteneinnahmen können das Risiko erhöhen eine Adipositas zu entwickeln [4]. Die Diagnostik der Adipositas erfolgt über den Body-Mass-Index (BMI). Der BMI wird definiert als der Quotient aus dem Körpergewicht in Kilogramm und dem

Quadrat der Körpergröße in Metern ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Im Erwachsenenalter spricht man von Übergewicht bei einem BMI von  $25,0\text{-}29,9\text{kg}/\text{m}^2$ , von einer Adipositas Grad I bei einem BMI von  $30\text{-}34,9\text{kg}/\text{m}^2$ , einer Adipositas Grad II bei einem BMI von  $35\text{-}39,9\text{kg}/\text{m}^2$  und ab einem BMI von  $40\text{kg}/\text{m}^2$  liegt eine Adipositas Grad III oder Adipositas permagna vor [4]. Bei Kindern verändert sich der BMI alters- und geschlechtsbedingt. Deshalb wird in den Leitlinien der Deutschen Adipositas Gesellschaft (DAG) e.V. empfohlen, Adipositas bei Kindern anhand von geschlechts- und altersspezifischen Perzentilen für den BMI zu diagnostizieren (s. Abb. 1). Hierbei liegt ein Übergewicht ab einem BMI oberhalb der 90. geschlechts- und altersspezifischen Perzentile vor, eine Adipositas liegt ab einem BMI oberhalb der 97. geschlechts- und altersspezifischen Perzentile vor und von einer extremen Adipositas spricht man ab einem BMI > 99,5 Perzentil [5]. Der alters- und geschlechtsspezifische „standard deviation score“ (BMI-SDS) verdeutlicht, inwiefern ein Kind von dem für sein Alter und Geschlecht durchschnittlichen BMI abweicht. Ein Normalgewicht liegt bei einem BMI-SDS von -2 bis +2 vor.

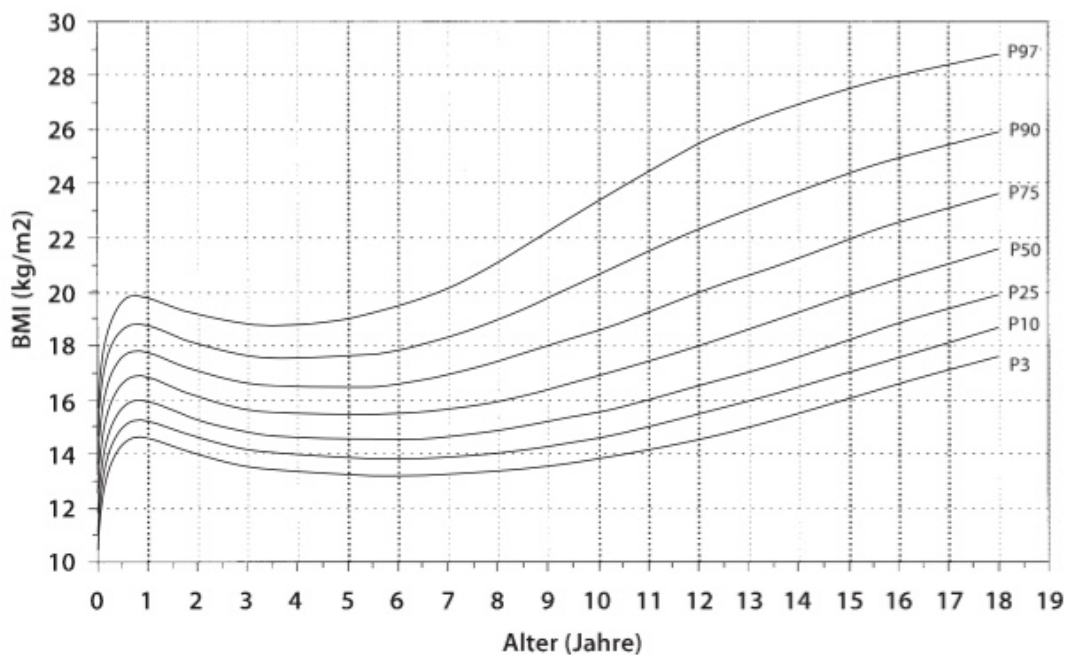


Abbildung 1: Perzentilkurven für den BMI für Jungen zur schnellen Analyse von Untergewicht, Normalgewicht oder Übergewicht [9]

## **1.2. Die Regulation des Körpergewichts**

Das Körpergewicht eines Individuums zeigt sich über einen längeren Zeitraum relativ stabil [10]. Ein konstantes Körpergewicht entsteht durch ein Gleichgewicht zwischen Energieaufnahme und Energieverbrauch. Bereits in den 1970er Jahren konnte in einer Studie gezeigt werden, dass übergewichtige Menschen, die zunächst durch Fasten eine Gewichtsreduktion erzielt hatten, im Anschluss in einem Zeitraum von bis zu 7 Jahren wieder Gewicht zunahmten und sich dem ursprünglichen Körpergewicht annäherten [11]. Ratten, die einer limitierten Kalorienzufuhr für einen gewissen Zeitraum ausgesetzt waren, zeigten eine Gewichtsabnahme. Sobald die Kalorienrestriktion aufgehoben wurde, zeigten sie eine Hyperphagie bis zum Erreichen des Ausgangsgewichts [12]. Eine Überfütterung von Ratten zeigte eine Hypophagie und Gewichtsabnahme im Anschluss an die Überfütterungsperiode [13]. Diese Untersuchungen legten die Annahme nahe, dass die Homöostase des Körpergewichts physiologischen Prozessen unterliegt und das Körpergewicht im Rahmen eines individuellen „Gewichts-Set-Points“ stabil gehalten wird. In einer weiteren Studie zur Regulation des Körpergewichts, bei der Probanden eine den Bedarf übersteigende Kalorienmenge zugeführt wurde, zeigten alle Probanden eine Gewichtszunahme. Es zeigte sich aber eine hohe interindividuelle Variabilität in der Gewichts- und Körperfettzunahme, die nicht auf das Geschlecht, das Ausgangsgewicht, die Dauer der erhöhten Kalorienzufuhr, die Nahrungszusammensetzung oder das Rauchverhalten zurückzuführen war [14].

### **1.2.1. Interindividuelle Variabilität des Körpergewichts**

Auf der Suche nach der Ursache für die hohe interindividuelle Variabilität des Körpergewichts bei Individuen gleichen Alters, gleichen Geschlechts und gleicher Ethnie sowie für die interindividuelle Variabilität in der Reaktion auf eine erhöhte Kalorienzufuhr, zeigte eine Adoptionsstudie erste Hinweise auf einen genetischen Einfluss bei der Körpergewichtsregulation. Dabei zeigten Adoptivkinder in ihrem BMI wenig Übereinstimmung mit ihren Adoptiveltern. Sie wiesen jedoch eine hohe Ähnlichkeit zu ihren biologischen Eltern auf [15]. Eine weitere Studie zeigte bei monozygoten Zwillingen, die an verschiedenen Orten aufwuchsen, eine hohe Übereinstimmung im BMI [16]. Eine überschüssige Kalorienzufuhr von 1000kcal an 84 von 100 Studientagen zeigte an zwölf männlichen eineiigen Zwillingspaaren, dass die beiden Individuen eines Zwillingspaars auf diese übermäßige Energiezufuhr über einen längeren Zeitraum mit einer ähnlichen Veränderung der

Körperzusammensetzung und Fettverteilung reagierten. Beim Vergleich der zwölf Zwillingspaare untereinander zeigte sich jedoch eine hohe Variabilität [17].

### **1.2.2. Einfluss der Genetik auf die Körpergewichtsregulation**

Diese oben beschriebenen Adoptions- und Zwillingsstudien deuteten auf einen genetischen Einfluss in der Regulation des Körpergewichts hin, der in vielen weiteren Zwillings- und Familienstudien quantifiziert wurde. In einer Metanalyse wurden 2012 die Daten aus 31 Zwillingsstudien sowie 27 Familienstudien zusammengefasst. Es zeigt sich in Zwillingsstudien eine Erblichkeit der Adipositas von 47-90% und in Familienstudien von 24-81%. Diese Zahlen weisen eine weite Spanne auf, die zum Teil durch Studiendesign erklärt werden kann. Insgesamt zeigen sie aber, dass der genetische Einfluss auf das Körpergewicht hoch ist [18].

#### **1.2.2.1. Identifikation des ersten Gens der Körpergewichtsregulation**

Die Identifikation und Sequenzierung eines Gens, das eine Rolle in der Regulation des Körpergewichts spielt, gelang 1994 erstmals Zhang et al. Es wurde gezeigt, dass das *Leptin*-Gen in der *ob/ob*-Maus mutiert ist [19]. Die *ob/ob*-Maus entstand spontan 1949. Sie zeigt Hyperphagie, Hyperinsulinämie sowie Hyperglykämie und wurde für Studien zu Übergewicht und Diabetes verwendet [20]. Mit der Identifikation der Genmutation konnte das Hormon Leptin identifiziert werden, dessen Mangel eine entscheidende Rolle in der Entstehung des Übergewichts der Mäuse spielte.

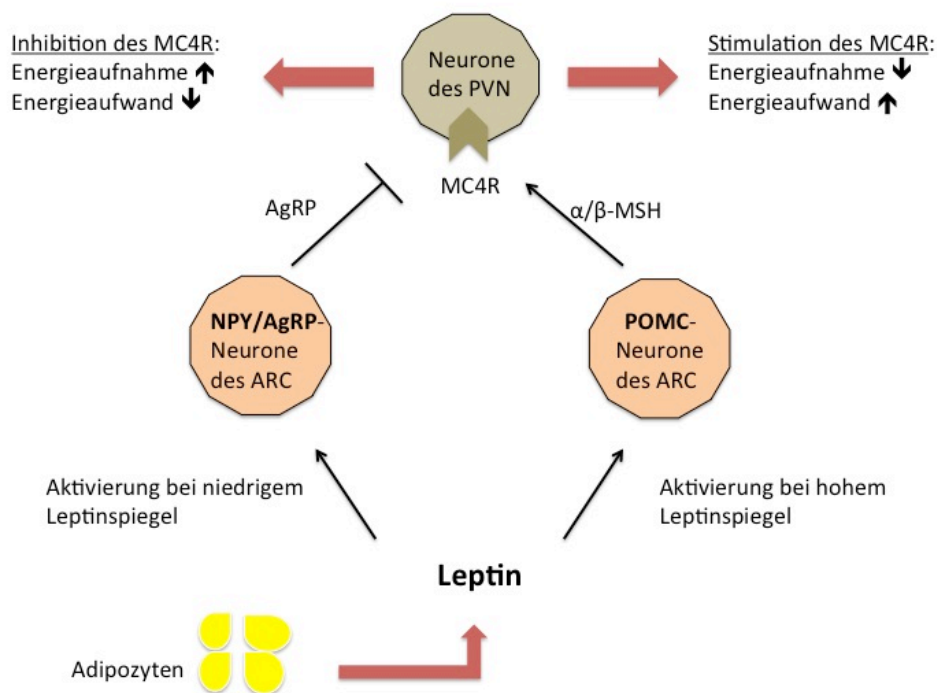
#### **1.2.3. Der Leptin-Melanocortin-Signalweg**

Nach der Identifikation des *Leptin*-Gens folgte die Aufschlüsselung des Leptin-Melanocortin-Signalwegs (s.Abb. 2), über den Leptin das Körpergewicht physiologisch reguliert. Leptin wird von Adipozyten synthetisiert und bei Triglyzeridakkumulation in der Zelle sezerniert. Der Leptinspiegel im Plasma korreliert mit dem Körpergewicht [21].

Das Gen des Proopiomelanocortins (POMC) besteht aus drei Exons und zwei Introns [22]. POMC wird posttranslational gewebsspezifisch in verschiedene Peptidhormone gespalten. Dazu zählen Adrenocortikotropes Hormon (ACTH), Melanozytenstimulierende Hormone ( $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH,  $\gamma$ -MSH), Corticotropin-like intermediate peptide (CLIP), Lipotropine ( $\beta$ -Lipotropin und  $\gamma$ -Lipotropin) sowie  $\beta$ -Endorphin. Im Hypothalamus wird POMC durch die Expression der Prohormon Convertase 2 (PC2) zu  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH und  $\gamma$ -MSH prozessiert [23].

Leptin vermittelt seine Wirkung an Neuronen über die lange Isoform des Leptinrezeptors (LEPR-B). Der Leptinrezeptor ist vorrangig in den Kernen des Hypothalamus lokalisiert, darunter auch im Nucleus arcuatus (ARC) [24]. Im ARC gibt es zwei Neuronenpopulationen. Die anorexigene Neuronenpopulation synthetisiert POMC. Diese Neuronen werden von Leptin stimuliert [25]. Die posttranslationale Prozession von POMC führt zu Melanotropinen, darunter  $\alpha$ -MSH und  $\beta$ -MSH, welche die Energieaufnahme negativ beeinflussen. Sie vermitteln ihre Wirkung über den Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R) im paraventriculären Nucleus (PVN) des Hypothalamus [26]. MC4R-knockout Mäuse zeigen eine Hyperphagie, Gewichtszunahme und Hyperinsulinämie [27]. Die Stimulation des MC4R führt zu einer verminderten Nahrungsaufnahme und einem erhöhten Energieaufwand.

Die zweite Neuronenpopulation des Nucleus arcuatus ist orexigen und synthetisiert Neuropeptid Y (NPY) und agouti related peptide (AgRP). Da Leptin eine inhibierende Wirkung auf NPY/AgRP-Neurone aufweist, werden diese aktiviert, sobald der Leptinspiegel sinkt. AgRP ist ein Antagonist am MC4R [28] und führt zu Gewichtszunahme und erhöhter Energieaufnahme. Eine permanente Zufuhr von NPY führt zu Hyperphagie, Gewichtszunahme und begünstigt Adipositas [29].



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Leptin-Melanocortin-Signalwegs (ARC=nucleus arcuatus, NPY=Neuropeptid Y, AgRP=agouti related peptide, POMC=Proopiomelanocortin, PVN=paraventriculärer Nucleus, MC4R=Melanocortin-4-Rezeptor, MSH= Melanozyten-stimulierendes Hormon)

### **1.3. Genetische Faktoren der Körpergewichtsregulation**

#### **1.3.1. Monogenetische Ursachen der Adipositas**

Monogenetische Erkrankungen werden durch einen Defekt in einem einzelnen Gen ausgelöst. Auf der Suche nach Faktoren, die den hohen genetischen Einfluss auf die Körpergewichtsregulation erklären, wurden zunächst Genmutationen im Rahmen des Leptin-Melanocortin-Signalweges in Betracht gezogen. Mutationen im *Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R)*-Gen sind die häufigste monogenetische Ursache der Adipositas. Es wurden bisher mehr als 150 Mutationen im *MC4R*-Gen identifiziert [30]. 1-6% der Fälle früh-manifester Adipositas und schwerer Adipositas im Erwachsenenalter werden mit *MC4R*-Mutationen in Verbindung gebracht [31]. Seltener sind Mutationen im *Leptin*-Gen, die zu schwerer Adipositas und Typ II Diabetes führen [19] oder Mutationen im *Melanocortin-3-Rezeptor*-Gen, wovon nur wenige eine funktionelle Rolle spielen [32]. Patienten mit einem vollständigen Funktionsverlust im *POMC*-Gen aufgrund einer homozygoten loss-of-function-Mutation oder einer komplex heterozygoten Mutation im *POMC*-Gen weisen eine früh-manifeste Adipositas, Veränderungen in der Pigmentierung wie zum Beispiel rotes Haar oder blasse Haut und einen Hypocortisolismus auf [33]. Eltern und Verwandte von Kindern mit einer homozygoten Mutation im *POMC*-Gen, die selbst eine heterozygote *POMC*-Mutation aufweisen, neigen zu Übergewicht mit einer Prädisposition für Adipositas auf. Das spricht für einen Gendosiseffekt des *POMC*-Gens [34].

#### **1.3.2. Genomweite Assoziationsstudien**

In genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) wurde nach Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) assoziiert mit dem Körpergewicht gesucht. Bei der bisher größten Untersuchung, einer Metaanalyse vom „Genetic Investigation of Anthropometric Traits (GIANT)“ Consortium, wurden ca. 2,8 Millionen SNPs in 123.865 Teilnehmern auf ihre Assoziation mit dem BMI untersucht. Dabei zeigten 42 SNPs eine Assoziation mit dem BMI. Diese wurden in einer zweiten Kohorte mit 125.931 Probanden untersucht. Im Ergebnis wurden 14 bereits bekannte SNPs bestätigt und 18 neue SNPs identifiziert. Der SNP im *FTO*-Gen ist alleine für 0,37% der Varianz im BMI verantwortlich und damit der einflussreichste Faktor [35]. Eine weitere genomweite Assoziationsstudie zeigte 14 SNPs die mit der Waist-to-hip-Ratio assoziiert sind [36]. Die Waist-to-hip-Ratio ist ein Maß für die Fettverteilung und wichtig für die



Absschätzung der Folgerisiken von Übergewicht.

Eine Studie von Naukkarinen et al. 2010 hat versuchte Genveränderungen zu finden, die ursächlich für eine Adipositas sein könnten. Dazu wurden in einem neuartigen Ansatz Fettgewebsbiopsien monozygoter Zwillinge mit hoher Differenz im BMI untersucht. Ziel war die Identifikation von Genen, die bei dem Zwilling mit dem höheren BMI als Reaktion auf das Übergewicht eine veränderte Expression im Fettgewebe zeigten. Zeitgleich wurden in einer zweiten Kohorte Fettgewebsbiopsien unverwandter Individuen auf veränderte Genexpressionen untersucht, die in Assoziation mit dem BMI auftraten. Veränderte Genexpressionen, die sich in beiden Kohorten zeigten, wurden als „reaktiv“ auf das Übergewicht gewertet. Veränderte Genexpressionen, die nur in der zweiten Kohorte auftraten, wurden als „potentiell kausal“ in der Entstehung von Übergewicht gewertet. Die dazugehörigen Genabschnitte wurden in einer dritten Kohorte auf SNPs, die mit dem BMI assoziiert sind, untersucht. Es wurden schlussendlich 13 Gene mit SNPs verifiziert, die eine kausale Rolle in der Adipositasentstehung spielen könnten. Die stärkste Assoziation zeigte ein SNP im *F13A1*-Locus, der in der Gerinnungskaskade (Faktor XIII) beteiligt ist [37].

Eine neue Methode, die „Genome-wide complex trait analysis (GCTA)“, versucht ebenfalls die Diskrepanz zwischen bekannten genetischen Ursachen der Adipositas und dem geschätzten genetischen Einfluss zu erklären. Bei der GCTA wird im Gegensatz zur GWAS nicht nach der Assoziation von einzelnen SNPs mit einem bestimmten Phänotyp gesucht, sondern nach dem gesamten additiven Effekt mehrerer bekannter SNPs. In der ersten durchgeführten GCTA zur Adipositas im Kindesalter wurde an 2269 Kindern der genetische Einfluss von bekannten SNPs auf den BMI untersucht. 30% des genetischen Einflusses auf das Körpergewicht können durch den in der GCTA ermittelten additiven Effekt bereits bekannter SNPs erklärt werden [38]. 2015 stellten Yang et al. eine neue Methode zur Kalkulation der Erblichkeit von komplexen Merkmalen vor: GREML-LDMS. Mit GREML-LDMS wurde kalkuliert, dass durch 17 Millionen bekannte genetische Varianten aus dem „1000-Genome-Project“ 27% der Unterschiede im BMI erklärt werden können [39].

### **1.3.3. „Missing heritability“**

Zwillings- und Familienstudien schätzen die genetische Prädisposition für Übergewicht/Adipositas auf 40-70%. Die Ergebnisse bisheriger Genomstudien können

diesen hohen genetischen Einfluss nur unzureichend erklären. Dieses Phänomen existiert nicht nur für die Adipositas, sondern auch für andere komplexe Erkrankungen und wird als „Missing heritability“ bezeichnet [40].

#### 1.4. Epigenetik

Auf der Suche nach weiteren genetischen Komponenten, die die „Missing heritability“ erklären könnten, wurden auch epigenetische Variationen in Betracht gezogen.

Die Epigenetik beschreibt Mechanismen, die zur Veränderung der Genexpression ohne Veränderung der DNA-Sequenz führen. Eine veränderte Genexpression von Genen, die einen Einfluss auf die Körpergewichtsregulation haben, könnten die Adipositasentstehung begünstigen. Sollte die Penetranz eines für die Körpergewichtsregulation relevanten Gens epigenetisch kontrolliert sein, könnten darüber epigenetische Modifikationen die Entwicklung von Übergewicht ebenfalls beeinflussen [41].

Es gibt in der Epigenetik zwei wesentliche Mechanismen, die zur Veränderung der Transkription eines Gens führen können: die DNA-Methylierung und die Histonmodifikation. Die DNA-Methylierung ist der am häufigsten untersuchte Mechanismus.

##### 1.4.1. DNA-Methylierung

Unter der DNA-Methylierung versteht man die Kopplung einer Methylgruppe an ein DNA-Nukleotid, in den meisten Fällen an das Cytosin eines Cytosin-phosphatidyl-Guanin(CpG)-Dinukleotids (s. Abb. 3). Ein CpG-Dinukleotid entspricht der DNA-Sequenz 5'-CG-3'. Die Methylierung erfolgt an dem 5. C-Atom des Pyrimidinrings. Es entsteht dabei ein 5-Methylcytosin (5mC). Diese Reaktion wird durch das Enzym DNA-Methyltransferase katalysiert [42].

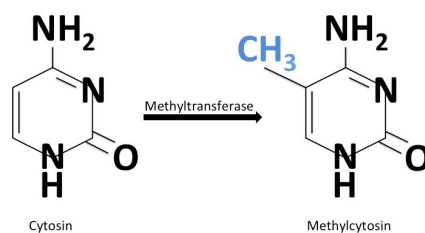


Abbildung 3: Schematische Darstellung der DNA-Methylierung

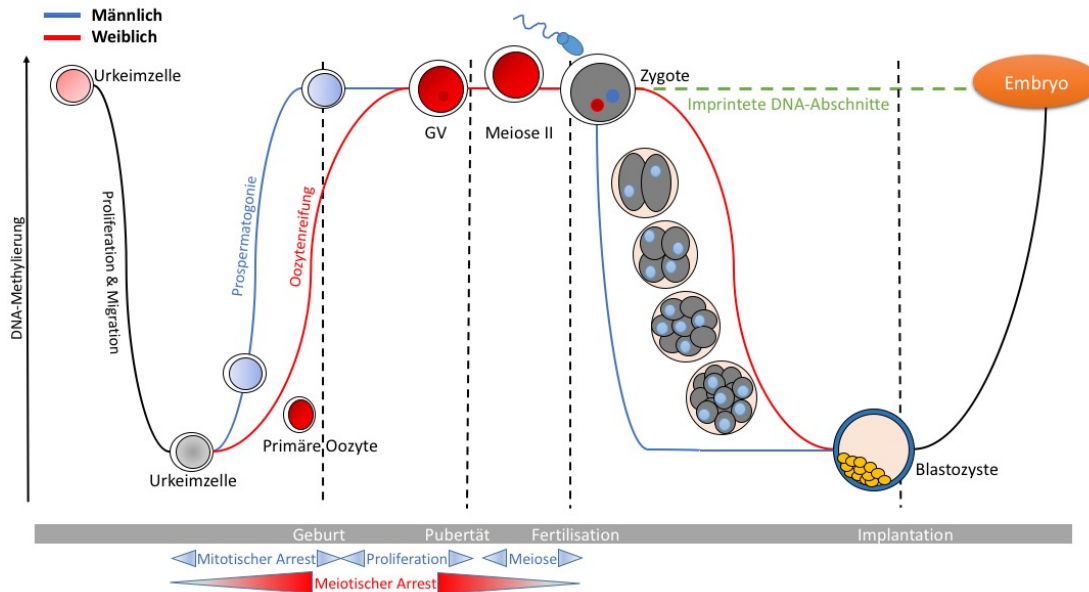
Durch die Methylierung eines Cytosins des DNA-Strangs kann die Genexpression beeinflusst werden. Methylierungen der DNA in der Promoterregion können dazu führen, dass Transkriptionsfaktoren nicht mehr binden können und das Gen nicht abgelesen werden kann. Andererseits binden Transkriptionsrepressoren, wie zum Beispiel das Methyl-CpG-Binding protein 1 (MeCP1), an methylierte Promoterregionen und unterdrücken über Histondeacetylierung die Transkription [43]. Außerdem bildet methylierte DNA eine Chromatinstruktur, die die Transkription inhibiert [44].

CpG-Dinukleotide kommen in der DNA-Sequenz seltener vor, als erwartet. Der CG-Anteil der DNA liegt bei 40%, sodass ein CpG-Nukleotid mit einer Wahrscheinlichkeit von 4% ( $0,2 \cdot 0,2 = 0,04$ ) auftreten müsste. Der tatsächliche CpG-Anteil liegt aber nur bei 0,8%, was durch die spontane Deamination von methyliertem Cytosin zu Thymin erklärbar ist [45]. CpG-Inseln bilden dabei eine Ausnahme.

CpG-Inseln sind durchschnittlich 1000 Basenpaare lang, haben einen erhöhten CG-Gehalt und sind reich an unmethylierten CpG-Dinukleotiden [46]. 72% der Promoter im Genom sind mit CpG-Inseln assoziiert [47]. Durch Methylierung dieser CpG-Dinukleotide kann ein Promoter deaktiviert werden.

#### **1.4.1.1. Entstehung und Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung**

Maternale und paternale Gene weisen unterschiedliche DNA-Methylierungsmuster auf. Kurz nach der Befruchtung werden durch einen zweistufigen Prozess die DNA-Methylierungen entfernt. Der paternale Pronukleus wird innerhalb von acht Stunden nach der Fertilisation vor der ersten Zellteilung aktiv demethyliert. Der maternale Pronukleus wird innerhalb der ersten Zellteilungen langsamer demethyliert (s. Abb. 4) [48]. Die Remethylierung erfolgt ab dem Blastozystenstadium durch die DNA-Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B [49]. Die DNA-Methyltransferase DNMT1 erhält die DNA-Methylierung über die Lebenszeit [50]. Eine gezielte Mutation in der murinen DNA-Methyltransferase führt zu einer Demethylierung und Letalität im Embryonalstadium und beweist die zentrale Bedeutung der DNA-Methylierung für das Überleben [51]. DNA-Methylierung spielt im Rahmen von Inaktivierung von Transposonen, X-Chromosom-Inaktivierung und Imprinting eine wichtige Rolle.



**Abbildung 4: DNA-Methylierung der Keimzellen: Demethylierung der Urkeimzelle → geschlechtsspezifische Remethylierung während der Reifung der Keimzellen → schnelle paternale Demethylierung nach Befruchtung, langsamere maternale Demethylierung → Remethylierung ab dem Blastozystenstadium (GV=Germinalvesikel) Abbildung modifiziert nach[52]**

#### 1.4.1.2. DNA-Methylierung im Rahmen von genomischen Imprinting

DNA-Methylierung kann zum Imprinting eines Gens führen. Imprintete Gene zeichnen sich dadurch aus, dass die Genexpression nur von dem paternalen oder nur von dem maternalen Allel erfolgt. Bei einem paternal imprinteten Gen ist die Transkription des paternalen Allels zum Beispiel durch Methylierung unterdrückt und die Genexpression erfolgt vom maternalen Allel [53]. Die Etablierung des Imprintings erfolgt während der Keimzellentwicklung und wird anschließend aufrechterhalten. Insbesondere von der De- und Remethylierung nach der Befruchtung sind imprintete Gene unbeeinträchtigt (s.Abb. 4 grüne Linie) [54]. Imprinting zeigt sich sehr stabil im Laufe des Lebens [55]. Fehlerhaftes Imprinting kann zu syndromalen Erkrankungen führen. Ein Verlust des maternalen Imprintings im *IGF2*-Gen führt zum Beckwith-Wiedemann-Syndrom, das sich durch Großwuchs, Organvergrößerung und eine Prädisposition für embryonale Tumoren kennzeichnet [56]. Beim Prader-Willi-Syndrom kommt es in der maternal imprinteten Region von Chromosom 15q11-q13 in 70% der Fälle zu einer Deletion der aktiven paternalen Region, in 25% zu einer maternalen Disomie und beim Rest zu Imprintingdefekten, die ein Modell für einen primär epigenetischen Defekt darstellen. Das Prader-Willi-Syndrom ist gekennzeichnet durch Hyperphagie mit früh-manifester Adipositas, Hypotonie und kognitiven Defiziten [57].

### **1.4.1.3. Variabilität und Stabilität der DNA-Methylierung**

Monozygote Zwillinge sind in ihrer genomischen DNA-Sequenz nicht voneinander zu unterscheiden und trotzdem weisen sie phänotypisch Unterschiede auf. Man versuchte diese phänotypischen Unterschiede durch interindividuelle Variabilität in der DNA-Methylierung zu erklären. In einem genomweiten Vergleich der DNA-Methylierung unterschieden sich erwachsene monozygote Zwillinge in 0,087-1,53% der über 450.000 untersuchten CpG-Positionen [58]. In der Diskussion um die Entstehung dieser epigenetischen Variabilität gibt es zwei gegensätzliche Theorien:

Die eine geht davon aus, dass das DNA-Methylierungsmuster angeboren, interindividuell verschieden und stabil über die Lebenszeit ist. Die andere gibt an, dass sich das Epigenom dynamisch verhält und Umwelteinflüsse im Laufe der Zeit zu epigenetischen Veränderungen und diese möglicherweise zur Entstehung von Krankheiten führen [59]. Für beide Annahmen gibt es Beispiele.

## **1.5. Epigenetik als dynamischer Prozess**

### **1.5.1. Studien an Erwachsenen**

Ob epigenetische Varianten ein dynamisches oder stabiles Verhalten über die Zeit darstellen, wurde gehäuft an monozygoten Zwillingen erforscht, da diese gleich alt sind, sich unter gleichen intrauterinen Bedingungen entwickelt haben, unter gleichen Bedingungen aufgewachsen sind und einen identischen genetischen Code haben und trotzdem phänotypische Unterschiede aufweisen. In einer Querschnittsstudie haben Fraga et al. 2005 monozygote Zwillingspaare verschiedenen Alters untersucht und festgestellt, dass die epigenetische Variabilität älterer monozygoter Zwillinge ausgeprägter war als die jüngerer Paare. Auch die Unterschiede in der Genexpression eines Zwillingspaars waren mit 50 Jahren größer als mit drei Jahren. Dieses Phänomen wurde als „epigenetic drift“ bezeichnet. Als Ursachen wurden sowohl externe Faktoren wie Rauchen, physische Aktivität, Diät und Lifestyle als auch interne Faktoren wie fehlerhafte Übertragung bei Zellteilung hypothetisiert [60]. Von 111 Probanden der „Age/Gene/Environment Susceptibility“ (AGES) Reykjavik Study zeigten 63% eine Methylierungszunahme oder -abnahme von mindestens 5% innerhalb von elf Jahren. Bei der Analyse des Methylierungsverhaltens innerhalb von Familien, die von der gleichen Arbeitsgruppe ausgeführt wurde, zeigte sich bei 40% der Probanden ein Methylierungsunterschied von  $\geq 5\%$  innerhalb von 16 Jahren. Mitglieder einer Familie

zeigten dabei ähnliche Methylierungsdynamiken[61].

In einer größer angelegten Studie mit 230 Paaren monozygoter Zwillinge im Alter von 18-89 Jahren wurde ebenfalls eine Zunahme interindividueller epigenetischer Unterschiede innerhalb eines Zwillingspaares mit steigendem Alter festgestellt. Die intraindividuelle Veränderung der DNA-Methylierung über einen Zeitraum von 10 Jahren war vergleichbar mit der Variabilitätszunahme der Querschnittsstudie [62].

### **1.5.2. Studien im Kindesalter**

Es wird hypothetisiert, dass die Dynamik der DNA-Methylierung im Kindesalter ausgeprägter ist als im Erwachsenenalter [63]. In einer longitudinalen Untersuchung an ein- und zweieiigen Zwillingen von Geburt bis zum Alter von 18 Monaten zeigt sich ein intraindividuelles dynamisches Methylierungsverhalten bei 1/3 der untersuchten CpG-Positionen, 2/3 zeigten sich stabil. Einige Zwillingspaare wurden in ihrem Methylierungsmuster unterschiedlicher, andere blieben stabil und einige wurden ähnlicher über die Zeit. Am häufigsten zeigte sich Variabilität in Genen assoziiert mit Entwicklungsprozessen. Die intraindividuelle Veränderung der DNA-Methylierung über die Zeit zeigte sich größer als die Zunahme der Methylierungsdiskordanz innerhalb eines Zwillingspaares. Dadurch wird die Hypothese unterstützt, dass individuelle Umweltfaktoren und stochastische Faktoren verantwortlich sind für den dynamischen Prozess [64]. Die Untersuchung dreier DNA-Loci assoziiert mit psychiatrischen Erkrankungen in dizygoten und monozygoten Zwillingen an zwei Zeitpunkten (5 und 10 Jahre) zeigte ein dynamisches Methylierungsverhalten in der Kindheit. Dabei wiesen monozygote Zwillinge hohe Unterschiede im Methylierungsverhalten auf [65]. In der bisher längsten longitudinalen Untersuchung ab Geburt, wurden bei zehn gesunden Mädchen 485.577 CpG-Positionen bis zu einem Alter von fünf Jahren untersucht. An 794 CpG-Positionen (0,16% der insgesamt analysierten CpGs) wurde ein Methylierungsunterschied im Laufe der Zeit festgestellt. Die betroffenen CpG-Positionen befanden sich gehäuft in Genen, welche mit der Entwicklung, neuronalen Prozessen und der Immunfunktion assoziiert waren [66].

## 1.6. Epigenetische Stabilität

### 1.6.1. Metastabile Epiallele als Beispiel für epigenetische Stabilität

Insgesamt zeigten die oben aufgeführten Studien, dass sich nur ein geringer Anteil an CpG-Positionen dynamisch verhält. Somit wurde die Annahme, dass epigenetische Variationen stabil sind, weiter untersucht. Ein Beispiel epigenetischer Stabilität sind metastabile Epiallele. Sie definieren sich wie folgt: Ein Epiallel zeichnet sich dadurch aus, dass eine gleichbleibende genomische DNA-Sequenz durch verschiedene epigenetische Konfiguration modifiziert sein kann. Diese verschiedenen epigenetischen Konfigurationen resultieren in phänotypischen Unterschieden. Ein Epiallel ist metastabil, wenn die epigenetische Konfiguration bei der *de novo* Methylierung im Blastozystenstadium stochastisch etabliert wird (siehe Abb.4 Seite 14) und diese Konfiguration im Laufe des Lebens stabil bleibt [67]. Metastabile Epiallele sind mit Transposonen assoziiert [68] und beeinflussbar durch die periconceptionelle maternale Nährstoffaufnahme [69].

Ein Beispiel eines metastabilen Epiallels der Maus ist das *viable yellow agouti* Allel ( $A^{vy}$ ), das zur Entwicklung von gelbem Fell, Übergewicht und Tumoranfälligkeit führt [70]. Es zeichnet sich durch die Insertion eines Intracisternal A particle (IAP) Retrotransposon am 5'-Ende des *Agouti(A)*-Allels aus. Das murine *Agouti(A)*-Gen kodiert für ein Signalmolekül, das in Melanozyten von Haarfollikeln die Synthese von gelbem Phäomelanin anstatt von schwarzem Eumelanin initiiert. Das *Agouti(A)*-Allel wird in Wildtypmäusen kurzzeitig während des Haarwachstums exprimiert, sodass ein heller Streifen auf jedem schwarzen Haar entsteht und das Fell braun wirkt [71]. Mäuse, die das mutierte *viable yellow agouti* Allel ( $A^{vy}$ ) heterozygot tragen ( $A^{vy}/a$ ), variieren in ihrem Phänotyp. Ihre Fellfarbe kann zwischen gelb über braun oder schwarz gefleckt auf gelbem Untergrund bis hin zur Agoutifarbe der Wildtyp-Mäuse, welches dann als „pseudoagouti“ bezeichnet wird, variieren.  $A^{vy}/a$  Mäuse mit braun-gelb-gefleckten Fell entwickeln Übergewicht und sind anfällig für Tumore.  $A^{vy}/a$  Mäuse mit „pseudoagouti“-Fell werden nicht übergewichtig und haben kein erhöhtes Tumorrisiko [72, 73]. Die unterschiedlichen Phänotypen bei gleichem Genotyp sind durch Methylierungsunterschiede im  $A^{vy}$  – Allel zu erklären. Schlanke  $A^{vy}/a$  Mäuse mit dunklem Fell wiesen eine erhöhte Methylierungsrate und somit Repression des Gens auf [73]. Am Beispiel des  $A^{vy}$  -Allels konnte ein Zusammenhang zwischen der DNA-Methylierung und der Fellfarbe sowie dem Körpergewicht festgestellt werden [74, 75]

Anhand des  $A^{vy}$  – Allels wurde gezeigt, dass metastabile Epiallele durch Umwelteinflüsse während ihrer Etablierung in der frühen embryonalen Entwicklung beeinflusst werden können. Muttertiere, die eine Nahrungsergänzung in Form von Methylspendern (Folsäure, Vitamin B12, Cholinchlorid und anhydrous Betain) erhielten, bekamen mehr „pseudoagouti“ Nachwuchs. Der Nachwuchs der supplementierten Mütter wies eine höhere Methylierungsrate im  $A^{vy}$  – Allel am 21. Lebenstag auf. Die erhöhte Methylierungsrate wurde in allen Gewebetypen identifiziert und war bis zum 100. Lebenstag stabil. Waterland und Jirtle schlussfolgerten, dass das Epigenom an den untersuchten CpG-Positionen des metastabilen Epiallels zum Zeitpunkt der Etablierung durch die Supplementierung mit Methylendonatoren beeinflusst werden kann. Danach zeigten sich die gesetzten epigenetischen Markierungen stabil [74].

#### **1.6.1.1. Humane metastabile Epiallele und der Einfluss periconceptioneller Nährstoffzufuhr**

Die ersten humanen metastabilen Epiallele wurden 2010 von Waterland et al. identifiziert. An den identifizierten Loci wiesen monozygote Zwillinge keine Gemeinsamkeiten auf. Dies deutet auf keinen genetischen Einfluss sondern eher auf eine stochastische Verteilung epigenetischer Marker an diesen Loci hin. Der Einfluss periconceptioneller, maternaler Nährstoffzufuhr auf die Etablierung des Epigenoms wurde anhand von Kindern aus ländlichen Regionen in Gambia untersucht. Die Kinder von Müttern, die in der nährstoffarmen Regenzeit schwanger wurden, wiesen im Vergleich zu Kindern, die während der nährstoffreichen Trockenzeit gezeugt wurden, eine signifikant höhere Methylierungsrate in den vermuteten metastabilen Epiallelen auf [76]. In einer zweiten Studie wurde gezeigt, dass die mütterlichen Plasmaspiegel von Nährstoffen des Methylstoffwechsels während der Konzeption einen Einfluss auf die Methylierungsrate des Nachwuchses haben [77].

#### **1.6.1.2. Der Einfluss von periconceptioneller Nährstoffzufuhr auf das Epigenom am Beispiel „Dutch Hunger Winter“**

Ein weiteres Beispiel für den Einfluss von Umweltbedingungen auf das Epigenom zum Zeitpunkt der Konzeption sind Individuen, die während des niederländischen Hungerwinters 1944/45 gezeugt wurden. Bei ihnen wurde eine Assoziation zwischen pränatalem Hunger und einem erhöhten BMI bei Frauen, erhöhten Gesamtcholesterin- und LDL-Cholesterinwerten sowie einer abnormen Glukosereaktion gefunden. Um diese phänotypischen Besonderheiten zu erklären, haben Heijmans et al. 2008 nach



epigenetischen Ursachen gesucht. Bei der Untersuchung der Probanden über 60 Jahre nach der Exposition wiesen diese im Vergleich zu ihren gleichgeschlechtlichen Geschwistern, die nicht vorgeburtlichem Hunger ausgesetzt waren, eine geringere Methylierung im imprinteten *IGF2*-Gen auf. Dieser Unterschied trat nur bei Hungerexposition während oder kurz nach der Konzeption auf, bei Hungerexposition in der späteren Schwangerschaft war kein Methylierungsunterschied feststellbar [78].

Insgesamt zeigen die Studien an Mäusen und Menschen, dass Umwelteinflüsse einzig zum Zeitpunkt der Konzeption von Bedeutung für die epigenetische Konfiguration der metastabilen Epiallele sind. Danach zeigen sich diese stabil.

### **1.6.2. Epigenetische Stabilität außerhalb von metastabilen Epiallelen**

Die Stabilität der DNA-Methylierung wurde auch abseits von metastabilen Epiallelen betrachtet. Dazu haben Talens et al. 2010 an 16 Loci in 30 Probanden die DNA-Methylierung auf interindividuelle Variabilität und Stabilität über die Zeit sowie Variabilität in verschiedenen Ursprungsgeweben untersucht. Sie fanden eine hohe interindividuelle Variabilität, die zumeist über einen längeren Zeitraum stabil war und eine Korrelation von DNA-Methylierungsmustern in verschiedenen Ursprungsgeweben [79]. In einer ersten prospektiven Studie, in der die DNA-Methylierung an Kindern von Geburt bis zum Alter von zwei Jahren untersucht wurde, konnte nur in 0,5% der untersuchten CpG-Positionen eine longitudinale Veränderungen gezeigt werden [80]. In einer anderen Studie zur Stabilität epigenetischer Markierungen wurden sowohl stabile als auch dynamische CpG-Positionen entdeckt. Dabei wurden in 74 Probanden aus der AGES (Age, Gene/Environment Susceptibility)-Kohorte ~4.5 Mio CpG-Positionen untersucht und 227 „variable methylated regions (VMRs)“ identifiziert. Die Hälfte dieser VMRs war stabil über einen Zeitraum von elf Jahren [59].

Ein weiteres Beispiel epigenetischer Stabilität stellen imprintete Gene (s.a. Abschnitt 1.4.1.2.) dar [55]. Ein häufig analysiertes imprintetes Gen ist das *GNASAS*-Gen. Eine Querschnittstudie zeigte, dass ältere monozygote Zwillinge, die sich im Rahmen dieser Studie an einigen Loci epigenetisch unterschiedlicher darstellten als jüngere monozygote Zwillingspaare, nicht verschiedener am *GNASAS*-Locus waren. Auch in einer longitudinalen Untersuchung zeigte sich keine Zunahme der interindividuellen Variabilität der monozygoten Zwillinge [62].

## 1.7. Epigenetik und die Regulation des Körpergewichts

Zur weiteren Aufschlüsselung des hohen genetischen Einflusses auf die Körpergewichtsregulation, wurde auch nach epigenetischen Variationen gesucht, die über ihren Einfluss auf die Genexpression eine Rolle spielen könnten. In der oben bereits beschriebenen Studie von Feinberg et al. wurden bei 74 Probanden ca. 4,5 Mio CpG-Positionen neben ihrer Stabilität auf ihre Kovarianz zum BMI in einer zweizweizeitigen Untersuchung im Abstand von elf Jahren untersucht. Es wurden 13 mit dem BMI assoziierte „variable methylated regions (VMRs)“ entdeckt. Vier davon wiesen sowohl zum Zeitpunkt der Untersuchung als auch 11 Jahre zuvor eine Kovarianz mit dem BMI auf. Alle VMRs waren in oder in der Nähe von Genen lokalisiert, die bereits mit der Gewichtsregulation oder Diabetes assoziiert worden waren [59].

Dick et al. haben in einer großen genomweiten Studie die Relation von DNA-Methylierung und dem BMI in zwei Kohorten untersucht. Dabei haben sie drei CpG-Positionen gefunden, bei denen eine erhöhte Methylierungsrate mit einem erhöhten BMI in beiden Kohorten assoziiert werden konnte. Alle drei CpG-Positionen befanden sich im Intron des *HIF3A*-Gens. Die Assoziation ließ sich nicht nur in DNA-Material gewonnen aus Blut, sondern auch in DNA-Material gewonnen aus Adipozyten darstellen [81]. In einer weiteren epigenomweiten Untersuchung wurden acht CpG-Positionen, die mit dem BMI assoziiert sind und fünf CpG-Positionen, die mit dem Taillenumfang assoziiert sind, entdeckt [82].

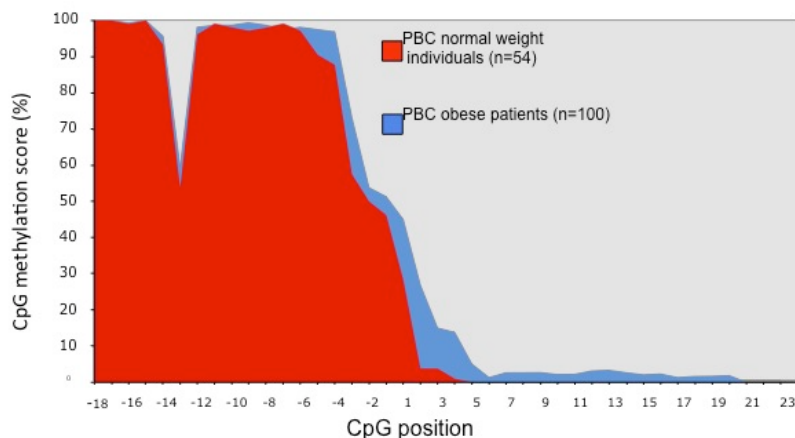
### 1.7.1. Epigenetische Kandidatengenstudie am *POMC*-Gen

Epigenetische Modifikationen können über ihren Einfluss auf die Genexpression einen Beitrag zur Krankheitsentstehung leisten [41]. Es wurde am *POMC*-Gen gezeigt, dass es sowohl Mutationen gibt, die zu Übergewicht führen [33], als auch SNPs, die mit dem BMI assoziiert sind [35]. Das *POMC*-Gen wurde deshalb für eine epigenetische Kandidatengenstudie ausgewählt, bei der nach CpG-Positionen gesucht wurde, deren Methylierungsstatus mit dem Körpergewicht korreliert. Dazu wurde der Methylierungsstatus von CpG-Positionen innerhalb von zwei CpG-Inseln untersucht. Die eine CpG-Insel ist in der Promoterregion des *POMC*-Gens lokalisiert und mit Ausnahme von zwei „Methylierungs-Peaks“ hypomethyliert. Die zweite CpG-Insel befindet sich am Intron2/Exon3-Übergang. Sie zeigt in normalgewichtigen Erwachsenen im Intron 2 eine Hypermethylierung, die in eine Hypomethylierung im Exon 3 übergeht. Diese Methylierungsmuster konnten nicht nur in peripheren Blutzellen, sondern auch in

MSH-positiven Neuronen des hypothalamischen Nucleus Arcuatus, die in der Körpergewichtsregulation eine entscheidende Rolle spielen, identifiziert werden.

Das Methylierungsmuster der beiden CpG-Inseln von 71 übergewichtigen Kindern wurde mit dem von 36 normalgewichtigen Kindern verglichen. In der ersten CpG-Insel zeigten sich keine Methylierungsunterschiede. Übergewichtige Kinder zeigten an der CpG-Insel am Intron2/Exon3-Übergang eine Extension der Hypermethylierung des Introns 2 in den normalerweise hypomethylierten Bereich des Exon 3 (s. Abb. 5) Dieser Unterschied konnte in einer zweiten Kohorte mit 100 übergewichtigen und 54 normalgewichtigen Kindern verifiziert werden. In 21 Probanden, die eine Adipositas im Alter von 13 bis 20 Jahren entwickelten, wurde die DNA-Methylierung im Alter von 5-13 Jahren mit der DNA-Methylierung nach der Adipositasentwicklung verglichen. Acht der untersuchten Probanden zeigten ein stabiles Methylierungsverhalten.

In der Untersuchung der Auswirkung der Hypermethylierung im Exon 3 auf die Genexpression zeigte sich, dass sie die Bindung des Transkriptionsfaktors P300 behindert und zu einer verminderten Genexpression führt. Es zeigte sich weiterhin, dass die Hypermethylierung eventuell durch Alu-Sequenzen des Introns 2 initiiert wird, da sich diese CpG-Positionen in Spezies ohne Alu-Sequenzen (Mäuse, Lemuren) hypomethyliert zeigten [83].



**Abbildung 5:** Hypermethylierung im Exon 3 (beginnend ab CpG-Position 1) des *POMC*-Gens bei übergewichtigen/adipösen Jugendlichen (PBC=peripheral blood cell) [83]

## 2. Fragestellung dieser Arbeit

In Familien- und Zwillingsstudien konnte ein hoher genetischer Einfluss auf die Entwicklung von Adipositas gezeigt werden. Monogenetische Untersuchungen und Einzelnukleotidpolymorphismen konnten die molekulare Ursache nur unzureichend erklären. In der Folge wurden epigenetische Modifikation, die über ihren Einfluss auf die Genexpression eine Bedeutung für die Adipositasentstehung haben könnten, untersucht. Die DNA-Methylierung ist dabei die am häufigsten untersuchte epigenetische Modifikation. Bei einer Assoziation zwischen dem Körpergewicht und der DNA-Methylierung ist es schwer zu differenzieren, ob das DNA-Methylierungsmuster Folge oder Ursache des erhöhten Körpergewichtes ist. Das beruht auf der Tatsache, dass die Untersuchung der Stabilität der DNA-Methylierung über die Lebenszeit bisher zwei gegensätzliche Verhaltensmuster gezeigt hat: Es gibt Genloci, die ein dynamisches DNA-Methylierungsverhalten aufzeigen und sich über die Zeit verändern und es gibt sogenannte metastabile Epiallele, imprintete Gene und andere Genloci, die stabil in ihrer DNA-Methylierung sind.

Eine mit dem BMI assoziierte veränderte DNA-Methylierung kann durch den hohen BMI entstanden sein oder seit der frühen Embryonalentwicklung bestehen und die Entwicklung von Adipositas begünstigen.

Auf der Suche nach epigenetischen Modifikationen mit Einfluss auf das Körpergewicht wurde am Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie eine epigenetische Kandidatengenstudie des *POMC*-Gens durchgeführt. Es wurde eine Assoziation der DNA-Methylierung des *POMC* Intron2/Exon3-Übergangs mit dem BMI beschrieben.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Stabilität der DNA-Methylierung dieses *POMC*-Locus untersucht werden. Es sollte dazu die DNA-Methylierung bei Geburt mit der DNA-Methylierung zu einem späteren Zeitpunkt im Kindes-, Jugend- oder frühen Erwachsenenalter verglichen werden.

Dabei sollten folgende Fragen untersucht werden:

- 1) Die Bestimmung der DNA-Methylierung bei Geburt sollte anhand von DNA gewonnen aus einer Neugeborenencreeningkarte erfolgen. Das Neugeborenencreening wird in Deutschland routinemäßig wenige Stunden nach der Geburt durchgeführt. Es gehört zur U2-Vorsorgeuntersuchung. Es sollte zunächst gezeigt werden, dass die aus dem Trockenblut einer

Neugeborenenenscreeningkarte extrahierte DNA für eine Analyse der DNA-Methylierung mittels Pyrosequenzierung verwendet werden kann. Dazu sollte zunächst die DNA-Extraktion aus dem Trockenblut, die Natriumbisulfitumwandlung, die DNA-Amplifikation mittels PCR und schlussendlich die Pyrosequenzierung erfolgen.

- 2) Die Bestimmung der DNA-Methylierung im späteren Leben (Kindes-, Jugend- oder frühes Erwachsenenalter) sollte anhand einer EDTA-Blutprobe erfolgen.
- 3) Die Methodik sollte anhand eines stabilen Locus validiert werden. Dazu sollten am Exon 1 des imprinteten *GNASAS*-Gens die CpG-Positionen 1 bis 5 untersucht werden.
- 4) Für die Untersuchung der Stabilität des *POMC*-Locus sollte die DNA-Methylierung der CpG-Positionen -2 bis 5 des Intron2/Exon3-Übergangs untersucht werden.
- 5) Sollte sich die DNA-Methylierung am *POMC*-Locus stabil zeigen, sollte überprüft werden, ob anhand der DNA-Methylierung zum Zeitpunkt der Geburt Rückschlüsse auf die BMI-Entwicklung gezogen werden können.
- 6) In Querschnittsstudien wiesen ältere monozygote Zwillingspaare größere DNA-Methylierungsunterschiede auf als jüngere Zwillingspaare. Die rekrutierten Probanden waren zum Zeitpunkt der EDTA-Blutentnahme unterschiedlich alt. Es sollte auch bei nachgewiesener Stabilität untersucht werden, ob sich ein Einfluss des Alters auf die DNA-Methylierung zeigt.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Probanden

Die Probanden wurden im Zeitraum von 2011 bis 2015 im Rahmen der Adipositasprechstunde und der allgemeinen endokrinologischen Ambulanz des Charité-Universitätsklinikums Berlins rekrutiert. Das einzige Ausschlusskriterium war ein anderer Geburtsort als Berlin.

Allen Probanden wurde EDTA-Vollblut entnommen. Zusätzlich wurde von allen Probanden die Neugeborenencreeningkarte im Neugeborenencreeninglabor des Labors Berlin herausgesucht. Die Neugeborenencreeningkarte wird in Deutschland im Rahmen der U2 Untersuchung und in aller Regel 36-72h nach der Geburt angelegt. Dabei wird den Neugeborenen Blut aus der Ferse oder selten aus der Vene entnommen. Mit dem Blut wird eine Filterpapierkarte durchtränkt. Das Trockenblut wird im Labor auf angeborene Hormon- und Stoffwechselerkrankungen untersucht, die eine schnelle Behandlung erfordern (z.B. Konnatale Hypothyreose).

##### 3.1.2. Primer

**Tabelle 1: DNA-Sequenzen der verwendeten PCR-und Sequenzierungs-Primer**

Gen	Primer	Typ	Sequenz
<i>POMC</i>	hPF31_F	fwd	GTGGTAAGATTTTAGATGTTTA
	hPF35bR	rev	Btn-AAAATAACCCATAACRTACTTC
	hPOMC3bis_S2_F	seq	GGTTGTTTTTATGTTTT
<i>GNASAS</i>	hGNASAS-F1	fwd	TGGGTAGGGGTTATGTTAATTAAGGTT
	hGNASAS-R1	rev	Btn-AACCCTAAAAATCTTCTTACTCCTCACCTTAC
	hGNASAS-S1	seq	GGGTGGGAGGTTTAATA

(fwd= forward primer/Vorwärtsprimer, rev= reverse primer/Rückwärtsprimer, seq= sequencing primer/Sequenzierungsprimer)

### 3.1.3. Kits

Kit	Verwendung	Firma
Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit	DNA-Extraktion EDTA-Blut	Promega, Fitchburg, USA
QIAamp® DNA Blood Mini Kit	DNA-Extraktion Neugeborenencreeningkarte	Qiagen, Venlo, NL
EZ DNA Methylation™ Kit	Bisulfitumwandlung	Zymo Research, Irvine, USA

### 3.1.4. Chemikalien, Lösungen und Puffer

Chemikalie	Firma	Firmensitz
Reinst. Ethanol	J.T. Baker	J.T. Baker
High performance liquid chromatography(HPLC)-H2O	Carl Roth	Karlsruhe, DE
DNA Leiter Easy Ladder I	Bioline	London, UK
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth	Karlsruhe, DE
10x Tris-Borat-EDTA(TBE)-Puffer	Carl Roth	Karlsruhe, DE
20x Tris-EDTA(TE)- Puffer	Promega	Fitchburg, WI,USA
Lambda DNA Standard 100µg/ml	Promega	Fitchburg, WI,USA
QuantiFluor®dsDNA Dye 200x	Promega	Fitchburg, WI, USA
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Bioline	London, UK
PCR Reaction Buffer Colorless	Bioline	London, UK
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)	Bioline	London, UK
MangoTaq	Bioline	London, UK
UltraPure™ Ethidium Bromid 1% Loading Dye	ThermoFischer	Waltham, MA, USA
Primer (s. Tabelle 1 S.24)	Laboreigen	
Beads Agencourt® AMPure XP	Beckman Coulter	Brea, CA, USA
Pyromark Q24 Advanced CpG Reagents (Enzyme Mix, Substrate Mix, Nukleotide, Binding Buffer, Annealing Buffer)	Qiagen	Venlo,NL

Pyromark Denaturation Buffer	Qiagen	Venlo, NL
Pyromark Wash Buffer	Qiagen	Venlo, NL
Streptavidin Sepharose High Performance	GE-Healthcare	GE-Healthcare
Buffer EB (elution buffer)	Qiagen	Venlo, NL

### 3.1.5. Geräte

Gerät	Firma	Firmensitz
Maxwell® IVD Instrument	Promega	Fitchburg, WI, USA
Quantus™ Fluorometer	Promega	Fitchburg, WI, USA
ThermoMixer®F1.5	Eppendorf	Hamburg, DE
ThermoMixer®FP	Eppendorf	Hamburg, DE
Mastercycler®nexus	Eppendorf	Hamburg, DE
Zentrifuge 5417R	Eppendorf	Hamburg, DE
Pyromark Q24 Advanced	Qiagen	Venlo, NL
Pyromark Q24 Vacuum Workstation	Qiagen	Venlo, NL
Gelkammer Compact XS/S	Biometra	Göttingen, DE
Geldokumentationssystem Gene FLASH	Syngene	Cambridge, UK

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Richtlinien

Die Satzung der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Arbeit wurde beachtet. Die Eltern der Patienten sowie die Patienten selber haben in die Untersuchung eingewilligt. Für die Studie liegt der Ethikantrag mit folgender Nummer vor: EA2/116/10

### 3.2.2. DNA-Extraktion

Die Extraktion genomischer DNA aus EDTA-Blut erfolgte mit Hilfe des Maxwell® 16 LEV Blood DNA Purification Kit nach Anweisung des Herstellers. Dazu wurden 300µl EDTA-Vollblut mit 300µl Lysepuffer und 30µl Proteinase K bei 56°C und 500rpm für 20 Minuten im ThermoMixer® inkubiert. Anschließend wurde die komplette Lyse in eine



Maxwell®-Kartusche überführt. Die weitere Extraktion, Aufreinigung und Elution erfolgte automatisch im Maxwell® IVD Instrument.

Die Extraktion genomischer DNA aus dem Trockenblut von Neugeborenencreeningkarten erfolgte mit Hilfe des QIAamp® DNA Blood Mini Kit nach Anweisung des Herstellers. Dazu wurde das Trockenblut der Neugeborenencreeningkarte in zwei bis sieben Stenzen mit einem Durchmesser von 3 mm unterteilt. Diese wurden mit 20µl Proteinase K und 180µl Lysepuffer versetzt und bei 56°C im ThermoMixer® bei 900 rpm für 1h inkubiert. Nach Zugabe eines zweiten Lysepuffers und 1µl Carrier RNA erfolgte eine zweite Inkubation im ThermoMixer® bei 70°C für 10 Minuten. Danach erfolgte eine Säulenaufreinigung und anschließend die Elution der DNA.

### **3.2.3. DNA-Quantifikation**

Um den Erfolg der DNA-Extraktion zu überprüfen und die extrahierte DNA-Menge zu bestimmen, wurde eine fluoreszenzbasierte Quantifizierung der DNA mittels Quantus™ Fluorometer durchgeführt. Dabei wird die DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff versetzt, der an doppelsträngige DNA bindet und bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge fluoresziert. Die DNA-Konzentration in der Probe korreliert dabei mit der Fluoreszenz. Das Quantus™ Fluorometer muss vor der Messung von Proben mit einer Standard-DNA mit einer Konzentration von 100ng/µl und einem Nullwert kalibriert werden. Anhand der entstandenen Kalibrationsgerade und dem Fluoreszenzwert der Probe errechnet das Fluorometer die DNA-Konzentration der Probe. Es wurde 1µl der eluierten DNA zur DNA-Quantifikation verwendet. QuantiFluour®dsDNA Dye wurde in 1xTE-Puffer auf einfache Konzentration verdünnt. 100µl dieser Lösung wurden 99µl 1xTE-Puffer und 1µl DNA zugefügt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe im Quantus™ Fluorometer gemessen.

### **3.2.4. Bisulfitumwandlung**

Zum Nachweis von Methylcytosin wurde die DNA mit Natriumbisulfit behandelt. Dabei wird die DNA-Base Cytosin zur RNA-Base Uracil deaminiert. 5'-Methylcytosin ist vor dieser Umwandlung geschützt. Uracil wird in der nachfolgenden PCR als Thymin amplifiziert (s. Abb. 6). Vergleicht man die DNA-Sequenz vor Bisulfitumwandlung mit der DNA-Sequenz nach Bisulfitumwandlung, kann somit ein methyliertes Cytosin von einem unmethylierten Cytosin unterschieden werden.

Taucht an einer Position in der DNA-Sequenz ein Thymin auf, wo sich vor der Bisulfitumwandlung ein Cytosin befand, war dieses Cytosin nicht methyliert. Nur bei einem methylierten Cytosin befindet sich auch nach der Bisulfitumwandlung noch ein Cytosin an gleicher Stelle in der DNA-Sequenz.

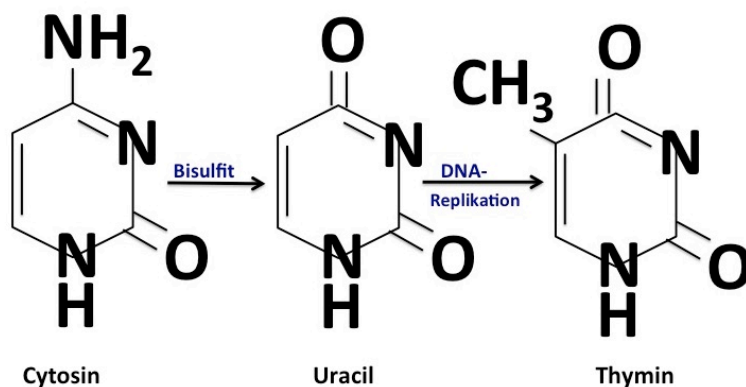


Abbildung 6: Darstellung der Deaminierung des Cytosins zu Uracil im Rahmen der Bisulfitbehandlung. Bei der DNA-Replikation während der PCR wird das Uracil dann als Thymin amplifiziert

Die Bisulfitumwandlung erfolgte mittels EZ DNA Methylation™ Kit nach Protokoll des Herstellers. Die DNA wurde mit einem Denaturierungspuffer für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Natriumbisulfitzugabe. Die DNA wurde mit dem Natriumbisulfit für 16h bei 50°C inkubiert. Es folgte sofort danach eine Inkubation bei 4°C für 10 Minuten. Danach wurde die DNA mit Hilfe einer Säule gereinigt. Die Entsulfatierung erfolgte ebenfalls in der Säule und benötigte eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach erneuter Reinigung der DNA kam es schlussendlich zur Elution.

### 3.2.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnitts, der durch die Zugabe von einem Vorwärts- und einem Rückwärtsprimer festgelegt wird. Soll das PCR-Produkt später mittels Pyrosequenzierung sequenziert werden, wird der Rückwärtsprimer mit einem Biotin versehen, sodass der 3'→5' DNA-Strang (nicht kodogener Strang) markiert ist. Dieser wird später bei der Vorbereitung zur Pyrosequenzierung herausgefiltert und für die Sequenzierung verwendet. So wird der 5'→3'-DNA-Strang (kodogener Strang) sequenziert. Für die DNA gewonnen aus

dem Trockenblut der Neugeborenencreeningkarte wurde die gleiche PCR angewandt wie für die aus dem EDTA-Blut gewonnene DNA.

### 3.2.5.1. PCR GNASAS

Ein CpG-reicher Abschnitt mit einer Länge von 353 Basenpaaren (Bp) innerhalb des GNASAS-Gens wurde amplifiziert. Es wurde als forward Primer hGNASAS-F1 und als reverse Primer hGNASAS-R1 (s.Materialien) verwendet. Es wurden pro Patient zwei Reaktionsansätze pipettiert, wobei einmal 5µl der aus der Neugeborenencreeningkarte extrahierten DNA und einmal 2,5µl der aus dem EDTA-Blut extrahierten DNA verwendet wurde. Für die beiden Ansätze wurden zu dem DNA-Template folgende Reagenzien mit den angegebenen Endkonzentrationen gegeben:

**Tabelle 2: PCR-Ansatz für den GNASAS-Locus**

Endkonzentration	Substrat
1x	PCR Reaction Mango Puffer ohne Dye
1,5mM	MgCl <sub>2</sub>
0,05mM	dNTPs
0,25µM	Forward Primer hGNASAS-F1
0,25µM	Reverse Primer hGNASAS-R1
25.000U/l	MangoTaq
Auffüllen mit H2O auf 50µl	

Der 50µl Ansatz wurde in vier Ansätze mit je 12,5µl aufgeteilt.

Die beiden Ansätze wurden bei folgendem Programm im Mastercycler®nexus inkubiert:

PCR Programm:

1 Zyklus	95°C	2 min
40 Zyklen	{	95°C      30s (Denaturierung)
		55,6°C    30s (Primer-Anlagerung)
		72°C      60s (Elongation)
1 Zyklus	72°C	8 min
→Runterkühlen 4°C ∞		

### 3.2.5.2. PCR POMC Intron2/Exon3-Übergang

Die CpG-Insel im Bereich des Übergangs vom Intron 2 zum Exon 3 des POMC-Gens wurde ebenfalls amplifiziert. Das PCR-Produkt ist 325bp lang. Der Primer hPF35R wurde als forward Primer verwendet und der Primer hPF35bR als reverse Primer. Es

wurden auch hier zwei Ansätze pro Patient pipettiert: ein Ansatz mit 5µl von der aus der Neugeborenencreeningkarte extrahierten DNA und ein Ansatz mit 2,5µl von der aus dem EDTA-Blut extrahierten DNA. Zu dem DNA-Template wurden in beiden Ansätzen folgende Reagenzien mit den angegebenen Endkonzentrationen pipettiert:

**Tabelle 3: PCR-Ansatz für den *POMC* Intron2/Exon3-Übergang**

Endkonzentration	Substrat
1x	PCR Reaction Mango Buffer ohne Dye
1,5mM	MgCl <sub>2</sub>
0,05mM	dNTPs
0,25µM	Forward Primer hPF35R
0,5µM	Reverse Primer hPF35bR
25.000U/l	MangoTaq
Auffüllen auf 50µl mit H <sub>2</sub> O.	

Der 50µl-Ansatz wurde auf vier Portionen mit je 12,5µl verteilt.

Die beiden Ansätze wurden bei folgendem Programm im Mastercycler®nexus inkubiert

PCR-Programm:

1 Zyklus	95°C	2 min
40 Zyklen	$\left\{ \begin{array}{l} 95^\circ\text{C} \\ 55,2^\circ\text{C} \\ 72^\circ\text{C} \end{array} \right.$	30s (Denaturierung)
		30s (Primer-Anlagerung)
		60s (Elongation)
1 Zyklus	72°C	8 min
→Runterkühlen 4°C		∞

### 3.2.6. Gelelektrophorese

Um den Erfolg der PCR zu überprüfen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Bei der Gelelektrophorese wandern geladene Teilchen durch ein elektrisches Feld und werden durch Unterschiede in Größe und Ladung aufgetrennt. Es kann somit bestimmt werden, ob die negativ geladenen DNA-Fragmente des PCR-Produkts die erwartete Größe haben. Durch die Zugabe eines DNA-bindenden Farbstoffes wird die Auftrennung sichtbar gemacht. Zur Größenbestimmung wird ein standardisierter DNA Marker verwendet.

Es wurde 1%iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurde das Agarosepulver kurz in 0,5-fachen TBE (TRIS-Borat-EDTA)-Puffer aufgekocht und dadurch gelöst. Anschließend

wurde 1µl des DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid zugegeben. Durch Abkühlen bildete sich das Agarosegel. Das Gel wurde in die Gelkammer mit 0,5-fachem TBE-Puffer gelegt. 3µl des PCR-Produkts wurden mit 1µl Loading Dye vermischt. Damit wurde das Gel beladen. Als DNA-Marker wurde Easy Ladder I verwendet, der eine Größenanalyse von 100-2000bp (100, 250, 500, 1000 und 2000bp als Fragmentgrößen) ermöglicht. Es wurde eine Spannung von 90mV für 20-25 Minuten angelegt. Danach wurde das Gel unter einer UV-Lampe betrachtet. Das Ethidiumbromid interkaliert in den Nukleinsäuren und fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht. Die Fluoreszenz ist proportional zum DNA-Gehalt des PCR-Produktes.

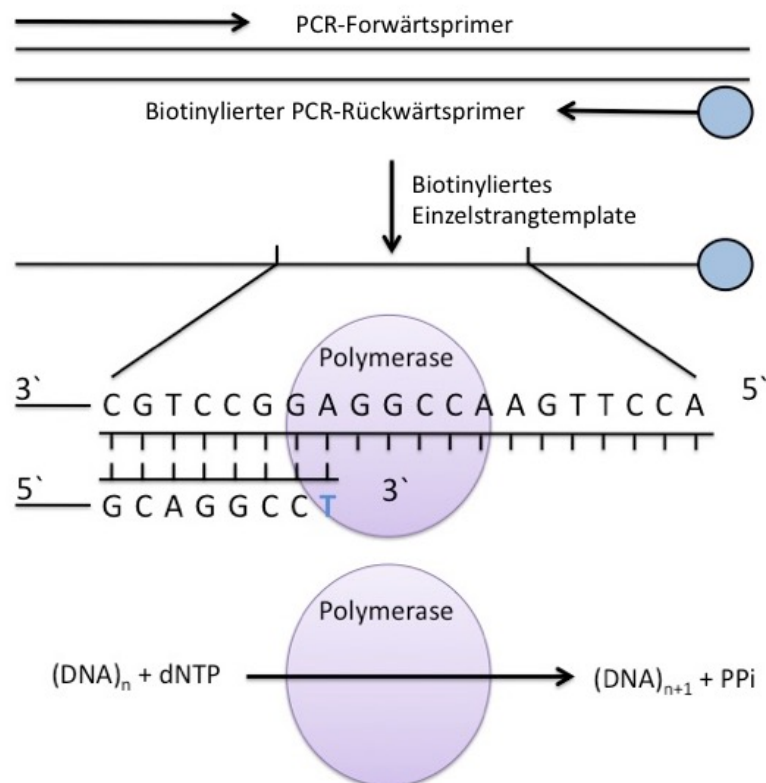
### **3.2.7. Aufreinigung der PCR mit magnetischen Beads**

Die PCR-Produkte der DNA, die aus der Neugeborenencreeningkarte extrahiert wurde, zeigten in der Gelelektrophorese oft eine schwächere Bande und starke Primer-Dimer. Aus diesem Grund erfolgte eine Aufreinigung speziell dieser PCR-Produkte. Zur Bereinigung der PCR-Produkte von Primer-Dimern, Salzresten und nicht verwendeten dNTPs wurden die magnetische Beads Agencourt® AMPure XP verwendet. Das PCR-Produkt der *POMC*-PCR wurde im Verhältnis 1:0,75 mit den Beads vermischt. Das PCR-Produkt der *GNASAS*-PCR wurde im Verhältnis 1:0,65 mit den Beads vermischt. Die DNA-Amplifikate wurden an die magnetische Beads gebunden. Durch einen Magneten wurden die an die Beads gebundenen Amplifikate von dem Überstand mit den Abfallprodukten getrennt. Der Überstand wurde verworfen und die DNA mit 80%igem-Ethanol zweimalig gereinigt. Mit 39µl Eluierungspuffer (Buffer EB) wurde die DNA von den Magneten gelöst und in ein sauberes Gefäß überführt.

### **3.2.8. Pyrosequenzierung**

Mit Hilfe der Pyrosequenzierung lassen sich die DNA-Sequenz sowie der Methylierungsgrad der Cytosin-Positionen innerhalb der DNA-Sequenz bestimmen. Streptavidin bindet an das Biotin des reversen Primers, der während der DNA-Amplifikation mittels PCR verwendet worden war. Vor der Pyrosequenzierung wird das PCR-Produkt denaturiert. Der reverse Strang mit dem biotinylierten Primer ist über Streptavidin-Kügelchen gebunden und bleibt somit erhalten. Er wird als Template-Strang für die Sequenzierung verwendet. An den Template-Strang lagert sich zunächst der Sequenzierprimer an. Danach werden die Enzyme DNA Polymerase, Adenosintriphosphat(ATP)-Sulfurylase, Luziferase und Apyrase sowie die Substrate

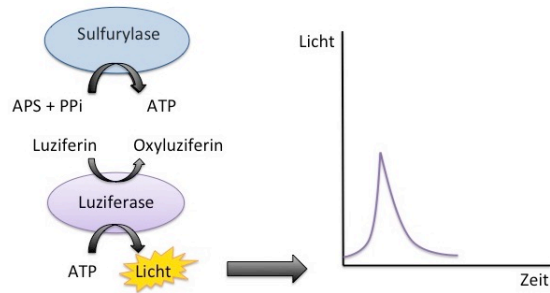
Adenosin-5-Phosphosulfat und Luziferin zugegeben. Dem Pyrosequenzierer wird die zu sequenzierende DNA-Sequenz vorgegeben. Es wird anschließend das erste Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) zugegeben, das komplementär zur ersten Base nach dem Sequenzierprimer sitzt. Die DNA-Polymerase baut das dNTP ein. Durch den Einbau des dNTPs wird Pyrophosphat (PPi) frei (vgl. Abb. 7).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Pyrosequenzierung I: Denaturierung der DNA, Verwenden des reversen Stranges als Template, Bindung Sequenzierprimer, Einbau dNTP durch Polymerase mit Freisetzung von Pyrophosphat (PPi), modifiziert nach [84]**

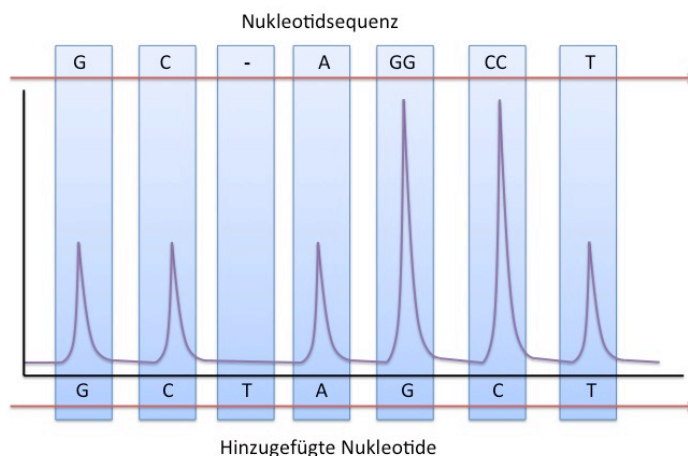
Die Menge des freigewordenen Pyrophosphat ist äquimolar zur Menge des eingebauten dNTP.

Die ATP-Sulfurylase katalysiert die Umwandlung von Pyrophosphat und dem als Substrat zugefügten Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) zu Adenosin-5'-Phosphat (ATP). Das ebenfalls beigefügte Enzym Luziferase benötigt ATP, um das Substrat Luziferin in Oxyluciferin umzuwandeln. Bei der Reaktion wird Licht freigesetzt. Die freigesetzte Lichtmenge ist proportional zur Menge des entstehenden ATPs (s. Abb. 8).



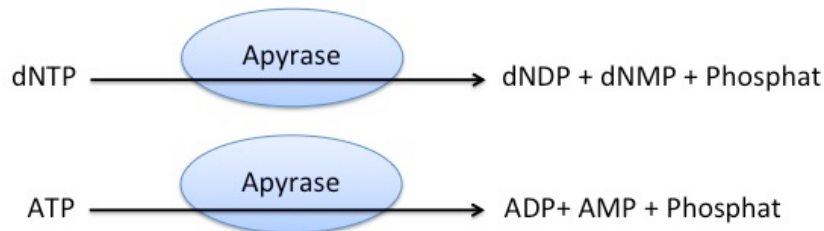
**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Pyrosequenzierung II: Umwandlung des Pyrophosphats (PPi) zu Adenosintriphosphat (ATP) und Umwandlung von ATP zu Licht ; modifiziert nach [84]**

Das Licht wird mit einem Charge-coupled Device (CCD)-Chip quantifiziert, durch eine Software verarbeitet und in ein Pyrogramm umgewandelt. Das Pyrogramm wird zur Auswertung verwendet. Folgen in der Nukleotidsequenz zwei identische Nukleotide aufeinander, wird das Nukleotid trotzdem nur einmal hinzugefügt. Da nun aber die zweifache Menge Pyrophosphat frei wird, ist das Lichtsignal doppelt so stark. Anhand des doppelt so hohen Lichtsignals registriert der Pyrosequenzierer, dass es sich in der DNA-Sequenz um zwei aufeinanderfolgende identische DNA-Basen handelt (vgl. Abb. 9).



**Abbildung 9 : Schematische Darstellung eines Pyrogramms: Das Thymin an Position 3 ist eine Kontrolle. Da kein Thymin in der DNA-Sequenz vorhanden ist, entsteht kein Lichtsignal. Das Guanin an Position 5 wird beim Hinzufügen zwei Mal hintereinander eingebaut. Das Lichtsignal ist daher doppelt so hoch wie bei den anderen Nukleotiden; modifiziert nach [84]**

Die Apyrase baut nicht eingebaute dNTPs zu Desoxyribonukleosiddiphosphaten (dNDPs), Desoxyribonukleosidmonophosphaten (dNMPs) und Phosphat ab und hydrolisiert ATP zu ADP und AMP und Phosphat.



**Abbildung 10: Abbau der dNTPs; modifiziert nach [84]**

Sobald ein Nukleotid abgebaut ist, wird das nächste Nukleotid freigesetzt und der Zyklus beginnt von vorne beim Einbau des dNTPs durch die DNA-Polymerase.

Beim Bestimmen des Methylierungsgrades eines Cytosins wird so vorgegangen, dass man dem Pyrosequenzierer bei Eingabe der zu sequenzierenden Sequenz vorgibt, dass er an der Position des methylierten Cytosins erst ein Desoxythymidintriphosphat und dann ein Desoxycytidintriphosphat zugeben soll. Mit Hilfe der Höhe der Peaks im Pyrogramm kann dann der Methylierungsgrad in Prozent errechnet werden.

Bevor die PCR-Produkte pyrosequenziert werden konnten, musste mit Hilfe der Pyromark Assay Design Software der geplante Pyrosequenzier-Run programmiert werden und an das Gerät übermittelt werden.

Es wurden zum Pyrosequenzieren 39µl des PCR-Produktes mit 1µl Streptavidin beschichteten Sepharosebeads und 40µl Pyromark Binding Puffer bei 900rpm für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur im ThermoMixer® inkubiert. Dabei erfolgte die Bindung des Streptavidins an das Biotin des reversen Primers des DNA-Stranges.

Anschließend wurden die Proben an der Pyromark Q24 Vacuum Workstation bearbeitet. An der Vakuumpumpe wurden die Sepharosebeads immobilisiert. Die an die Sepharosebeads gebundenen DNA-Templates wurden so für fünf Sekunden in eine Wanne mit 70%igen Ethanol zur Reinigung transferiert. Als nächstes erfolgte die Denaturierung der DNA in einer Wanne mit „Pyromark Denaturation Buffer“ für 10 Sekunden. Danach war nur noch der nicht-kodogene Strang mit dem Biotinmolekül am



reversen Primer gebunden. Zum Schluss wurden die Proben in einer Wanne mit „Pyromark Wash Buffer“ für 10 Sekunden gewaschen.

Der nicht kodogene DNA-Strang wurde dann in 20µl „Pyromark Annealing Buffer“, in dem der Sequenzierprimer mit einer Konzentration von 0,375µM gelöst worden war, gelöst. Es folgte eine Inkubation der Proben im ThermoMixer® für fünf Minuten bei 80°C. Währenddessen wurde die „Pyromark Cartridge“ mit Nukleotiden sowie der „Enzyme mixture“ und der „Substrate mixture“ beladen.

Es wurden die „Pyromark Cartridge“ und die Proben ins Gerät gestellt und die Pyrosequenzierung gestartet.

#### **3.2.8.1. Pyrosequenzierung am *GNASAS*- und *POMC*-Locus**

Als Sequenzierprimer wurde für den *POMC* Intron2/Exon3-Übergang der Sequenzierprimer hPOMC3bis\_S2\_F verwendet. Es wurden die CpG-Positionen -2 bis 5 analysiert. Zur Analyse der Methylierungsgrade an den CpG-Positionen 1 bis 5 des *GNASAS*-Gens wurde der Sequenzierprimer hGNASAS-S1 verwendet.

### **3.3. Statistische Auswertung**

Aus den prozentualen DNA-Methylierungen der CpG-Positionen 1 bis 5 des *GNASAS*-Locus wurde für jeden Probanden ein Mittelwert errechnet und somit die durchschnittliche Methylierung des DNA-Abschnitts ermittelt. Dies erfolgte ebenfalls für den *POMC* Intron2/Exon3-Übergangs von CpG-Position -2 bis 5. Die prozentuale durchschnittliche DNA-Methylierung der Regionen wurde auf Normalverteilung (D'Agostino & Pearson omnibus Normalitätstest) getestet. Auf einen statisch signifikanten Unterschied in der durchschnittlichen DNA-Methylierung der beiden Zeitpunkte wurde mit dem gepaarten t-Test untersucht. Die Korrelationsanalyse erfolgte durch Ermittlung einer linearen Regressionsgerade und dem Pearson-Korrelationskoeffizient für die durchschnittliche DNA-Methylierung des gesamten Locus. Die DNA-Methylierung der einzelnen CpG-Positionen -2 bis 5 des *POMC*-Locus wurde ebenfalls auf Normalverteilung (D'Agostino & Pearson omnibus Normalitätstest) geprüft. Die Korrelationsanalyse erfolgte durch Ermittlung einer linearen Regressionsgerade und dem Pearson-Korrelationskoeffizient für jede CpG-Position des *POMC* Intron2/Exon3-Übergang.

Es wurde ein Mittelwert der durchschnittlichen DNA-Methylierung der stabilen CpG-Positionen -2,-1,1 und 4 des *POMC* Intron2/Exon3-Übergangs zum Zeitpunkt des Neugeborenen Screenings errechnet. Die durchschnittliche DNA-Methylierung der

stabilen CpG-Positionen wurde ebenfalls auf Normalverteilung überprüft (D'Agostino & Pearson omnibus Normalitätstest). Es erfolgte eine Korrelationsanalyse der durchschnittlichen DNA-Methylierung der stabilen CpG-Positionen des *POMC* Intron2/Exon3-Übergangs und dem BMI-SDS.

Für das Alter und die durchschnittliche DNA-Methylierung bei EDTA-Blutentnahme erfolgte ebenfalls eine Korrelationsanalyse.

Die Berechnungen sowie die Erstellung von graphischen Darstellungen wurde mit dem Programm GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA, USA) durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

Das Ziel der Dissertation war die Überprüfung der Stabilität der DNA-Methylierung am Intron2/Exon3-Übergang des *POMC*-Gens vom Zeitpunkt der Geburt bis ins spätere Leben. Dazu sollte die DNA-Methylierung zum Zeitpunkt der Geburt mit der DNA-Methylierung im späteren Kindes-, Jugend- oder frühen Erwachsenenalter verglichen werden. Hierzu sollte die DNA-Methylierung bei Geburt anhand von DNA extrahiert aus dem Trockenblut einer Neugeborenen-Screeningkarte untersucht werden. Dazu musste zunächst die Etablierung einer Pyrosequenzierung von DNA-Proben, die aus dem Trockenblut einer Neugeborenen-Screeningkarte gewonnen worden waren, erfolgen. Die DNA-Methylierung im späteren Kindes-, Jugend- oder frühen Erwachsenenalter sollte anhand von DNA extrahiert aus EDTA-Blut erfolgen. Die Methodik sollte außerdem anhand eines als stabil geltenden Locus, dem imprinteten *GNASAS-Locus*, überprüft werden. Bei stabiler DNA-Methylierung im Intron2/Exon3-Übergang des *POMC*-Gens sollte zusätzlich analysiert werden, ob die DNA-Methylierung zum Zeitpunkt des Neugeborenen-Screenings eine Möglichkeit bietet, eine Aussage über die spätere Gewichtsentwicklung zu treffen. Außerdem sollte überprüft werden, ob das Alter einen Einfluss auf die DNA-Methylierung hat.

### 4.1. Probanden

Insgesamt wurde bei 96 rekrutierten Probanden im Alter von 0,4 bis 24 Jahren DNA aus der Neugeborenen-Screeningkarte und aus dem EDTA-Blut extrahiert. Darunter waren 47 weibliche Probanden und 49 männliche Probanden. Die Analyse der DNA-Methylierung konnte für den *GNASAS-Locus* an 35 Probanden und für den *POMC-Locus* an 55 Probanden erfolgen.

#### 4.1.1. Probanden des *GNASAS-Locus*

Die Analyse der DNA-Methylierung mittels Pyrosequenzierung an den CpG-Positionen 1 bis 5 des *GNASAS-Locus* erfolgte zur Überprüfung der Methodik an 35 Probanden. Unter den 35 Probanden waren 15 weibliche Probanden und 20 männliche Probanden im Alter von drei bis 16 Jahren zum Zeitpunkt der EDTA-Blutentnahme (Mittelwert 9,91 Jahre). Die folgende Tabelle gibt einen detaillierten Überblick über Alter und Geschlecht der einzelnen Probanden.

**Tabelle 4: Überblick über die untersuchten Probanden des *GNASAS*-Locus**

Probanden-Nr.	Alter	Geschlecht	Probanden-Nr.	Alter	Geschlecht
1	15	W	19	8	M
2	12	M	20	16	M
3	15	M	21	9	M
4	7	W	22	3	W
5	14	W	23	4	W
6	5	W	24	10	M
7	10	M	25	11	M
8	9	M	26	12	M
9	7	W	27	3	M
10	14	M	28	9	W
11	14	M	29	14	W
12	8	W	30	9	M
13	7	W	31	13	W
14	5	W	32	10	M
15	3	W	33	5	M
16	15	W	34	12	M
17	14	M	35	9	M
18	16	M			

#### 4.1.2. Probanden des *POMC* Intron2/Exon3-Übergangs

Die DNA-Methylierung der CpG-Positionen -2 bis 5 am *POMC* Intron2/Exon3-Übergang wurde an 55 Probanden (25 weiblich; 30 männlich) untersucht. Das durchschnittliche Alter bei Entnahme des EDTA-Bluts betrug 11,4 Jahre.

Die folgende Tabelle gibt einen detaillierten Überblick über Alter, BMI, BMI-SDS und Geschlecht der einzelnen Probanden.

**Tabelle 5: Überblick über die Probandendes *POMC*-Locus**

Probanden-Nr.	BMI	BMI-SDS	Alter	Geschlecht
1	27,71	3,87	5	W
2	23	2,67	6	W
3	21,3	2,57	5	W
4	28,5	4,72	3	W
5	26	2,52	9	M
6	21,5	1,89	8	W
7	40,6	3,56	9	M
8	22,3	2,83	5	W
9	27,3	2,64	9	W
10	32,13	2,99	10	W
11	37,74	2,97	14	M
12	31,17	2,51	14	W
13	26,9	2,62	9	M

14	27,6	2,33	11	M
15	33,6	3,02	10	M
16	31,6	2,6	12	M
17	22,3	3,17	3	M
18	37,3	4,65	5	M
19	25,1	3,44	5	W
20	25,1	2,39	9	M
21	26	1,83	13	W
22	36,4	2,95	12	M
23	35,6	3,33	9	M
24	25,9	2,28	10	M
25	25,6	4,42	2	W
26	26,7	2,07	12	M
27	21,7	2,72	5	M
28	31,23	2,58	13	W
29	38,66	3,09	16	M
30	38,65	3,09	16	M
31	30,61	2,4	15	W
32	36,19	2,87	14	M
33	25,1	3,99	3	W
34	34,82	2,85	12	M
35	16	-0,3	0,3	W
36	19,59	1,85	6	W
37	15,8	0,22	3	W
38	17,2	0,31	9	W
39	16,5	-0,44	11	W
40	17,07	-0,15	11	M
41	15,3	-0,25	15	M
42	23,46	1,71	11	M
43	41,2	3,17	14	M
44	26,02	1,52	16	M
45	18,7	-1,2	20	W
46	22,15	0,42	20	M
47	20,58	-0,27	24	W
48	20,66	-0,23	23	W
49	21,5	-0,09	22	M
50	26,5	1,41	24	M
51	35,8	2,84	15	M
52	20	-0,38	21	W
53	30,7	2,33	14	M
54	35,9	3,03	14	W
55	30	2,19	16	M

## 4.2. Etablierung einer Pyrosequenzierung für DNA extrahiert aus einer Neugeborenencreeningkarte

### 4.2.1. DNA-Extraktion aus Trockenblut und Einsatz dieser für eine Bisulfit-PCR

Da zu Beginn der Arbeit (Oktober 2014) noch keine vergleichbaren Versuche zur Bestimmung des Methylierungsmusters genomischer DNA gewonnen aus dem Trockenblut einer Neugeborenencreeningkarte (Beispiel s. Abb. 11) bekannt waren, wurden zunächst Vorversuche durchgeführt. Dazu wurden leere, unbenutzte Neugeborenencreeningkarten mit EDTA-Blut von Probanden getränkt und sofort nach dem Trocknen zur Analyse verwendet. Für die DNA-Extraktion wurde zunächst eine Stanze der Neugeborenencreeningkarte mit einem Durchmesser von ca. 4mm verwendet (vergleiche Abb. 11: im rot umkreisten Punkt ist aus dem Trockenblut genau eine Stanze entnommen worden). Dabei zeigte sich in der anschließenden DNA-Quantifikation mit dem Fluorometer eine DNA-Menge von <1ng. Es erfolgte anschließend die Bisulfitumwandlung.

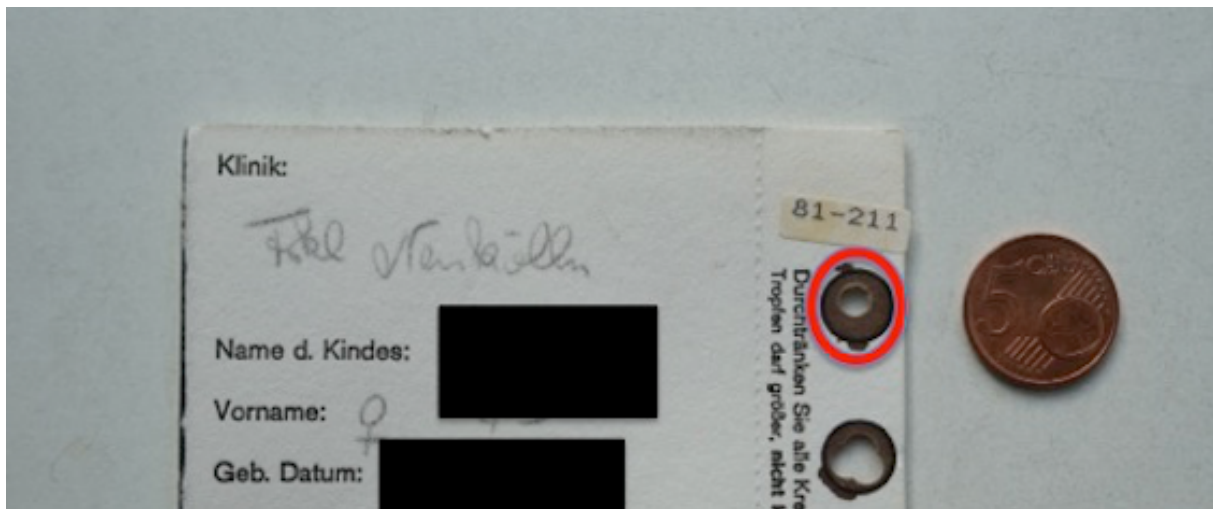


Abbildung 11: Beispiel einer Neugeborenencreeningkarte: der rote Kreis zeigt die Menge an Material an, die pro Patient vorhanden war. Es kam vor, dass ein Teil des zur Verfügung stehenden Kreises schon für frühere Analysen verwendet worden war (s.o. der untere, nicht rot umrandete Kreis) oder das vorgegebene Feld nicht vollständig durchtränkt worden war.

Mit der extrahierten DNA wurde nach der Bisulfitumwandlung eine PCR des *POMC* Intron2/Exon3-Übergangs durchgeführt. In der anschließenden Gelelektrophorese zeigte sich bei der DNA-Konzentration von <1ng vor der Bisulfitumwandlung keine nachweisbare Bande. Es folgten weitere DNA-Extraktionen aus dem Trockenblut mit anschließender Bisulfitumwandlung und Polymerasekettenreaktion zur Evaluation der

DNA-Menge, die mindestens extrahiert werden muss, um ein in der Gelelektrophorese nachweisbares PCR-Produkt zu erhalten. Es zeigte sich, dass bei einer DNA-Menge von  $\geq 2,8$  ng vor der Bisulfitumwandlung eine Bande in der Gelelektrophorese erkennbar wird und somit ein PCR-Produkt, das für die anschließende Pyrosequenzierung verwendet werden kann, vorliegt.

#### 4.2.2. Vergleichbarkeit der Materialien Trockenblut und EDTA-Blut

Zur Validierung der Vergleichbarkeit der DNA-Methylierung von DNA extrahiert aus EDTA-Blut und DNA extrahiert aus dem Trockenblut einer Neugeborenencreeningkarte wurde das Blut von zwei Probanden untersucht. Dafür wurde jedem Testprobanden EDTA-Blut abgenommen. Es wurde DNA direkt aus dem EDTA-Blut extrahiert, sowie dasselbe EDTA-Blut auf eine Neugeborenencreeningkarte getropft, die direkt nach dem Trocknen zur DNA-Extraktion verwendet wurde. Es wurde für jeden Testprobanden eine PCR für den *POMC* Intron2/Exon3-Übergang mit DNA gewonnen aus den beiden verschiedenen Materialien angefertigt. Anschließend erfolgte eine Pyrosequenzierung. Dabei zeigten sich die untersuchten CpG-Positionen vergleichbar (s. Tabelle 6).

**Tabelle 6: Vergleichbarkeit der DNA-Methylierung bei Betrachtung der verwendeten Materialien: Trockenblut der Neugeborenencreeningkarte und EDTA-Blut**

<b>CpG-Position <i>POMC</i> Intron2/Exon3-Übergang</b>	<b>-2</b> (DNA-Meth in %)	<b>-1</b> (DNA-Meth in %)	<b>1</b> (DNA-Meth in %)	<b>2</b> (DNA-Meth in %)	<b>3</b> (DNA-Meth in %)	<b>4</b> (DNA-Meth in %)	<b>5</b> (DNA-Meth in %)
Neugeborenencreeningkarte Patient 1	35	31	34	18	31	11	44
EDTA-Blut Patient 1	37	37	35	18	34	11	46
Neugeborenencreeningkarte Patient 2	37	36	42	25	48	14	58
EDTA-Blut Patient 2	42	41	41	23	37	13	50

### 4.3. DNA-Extraktion, PCR und Pyrosequenzierung der untersuchten Probanden

#### 4.3.1. DNA-Extraktion und Polymerasekettenreaktion der untersuchten Probanden

Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche, bei denen sich eine sehr geringe DNA-Menge bei Verwendung einer Stanze (ca. 3 mm Ø) der Neugeborenencreeningkarte gezeigt hatte, wurde im weiteren Vorgehen bei der DNA-Extraktion das komplette vorhandene Material der Neugeborenencreeningkarte verwendet (durchschnittlich zwei bis sieben Stanzen).

Ergab die DNA-Extraktion aus dem Trockenblut eine DNA-Menge  $< 2,8\text{ng}$  konnte keine PCR und keine Pyrosequenzierung durchgeführt werden. Es konnten daher nicht alle rekrutierten Probanden untersucht werden. Aus den Neugeborenencreeningkarten der untersuchten Probanden konnten je nach Durchtränkung und Größe des Trockenblutfeldes eine DNA-Menge zwischen 3,2 und 54ng gewonnen werden.

Aus dem EDTA-Blut wurde eine DNA-Menge von 300ng-10 $\mu\text{g}$  extrahiert. In der Gelelektrophorese zeigten die PCR-Produkte des EDTA-Bluts eine stärkere Fluoreszenz als die PCR-Produkte der DNA aus dem Trockenblut aufgrund der höheren DNA-Konzentration (s. Abb. 12).

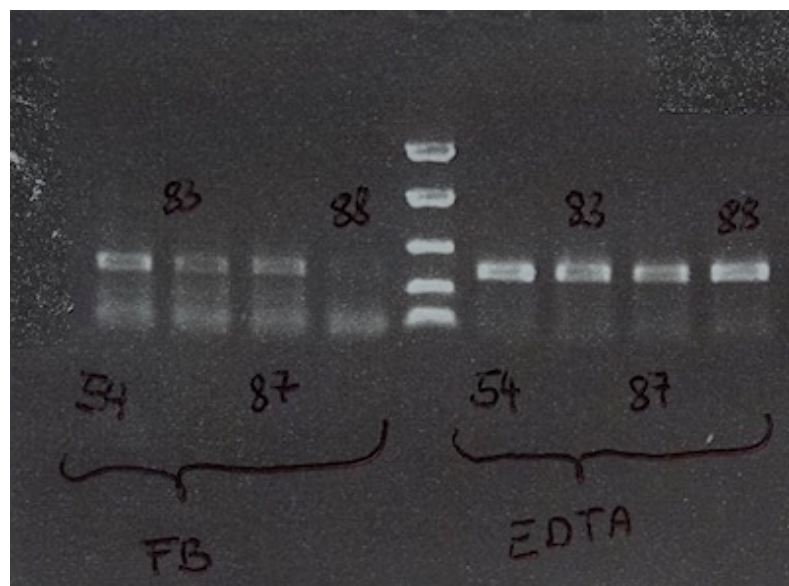


Abbildung 12: Beispiel einer Gelelektrophorese der PCR vom *POMC* Intron2/Exon3-Übergang. Abgebildet sind die Ergebnisse der PCR mit DNA aus Neugeborenencreeningkarten (links) sowie die PCR mit DNA aus EDTA-Blut (rechts).



#### 4.3.2. Pyrosequenzierung der DNA gewonnen aus Trockenblut und EDTA-Blut

Grundsätzlich zeigte sich, dass die DNA gewonnen aus dem Trockenblut einer Neugeborenen-Screeningkarte mittels Pyrosequenzierung untersucht werden kann.

Bei der aus dem Trockenblut gewonnenen DNA zeigte sich jedoch eine deutlich niedrigere Intensität des detektierten Lichtsignals im Vergleich zu der aus dem EDTA-Blut gewonnenen DNA (vgl. Abb. 13 die roten Pfeile verdeutlichen die Intensitätsunterschiede).

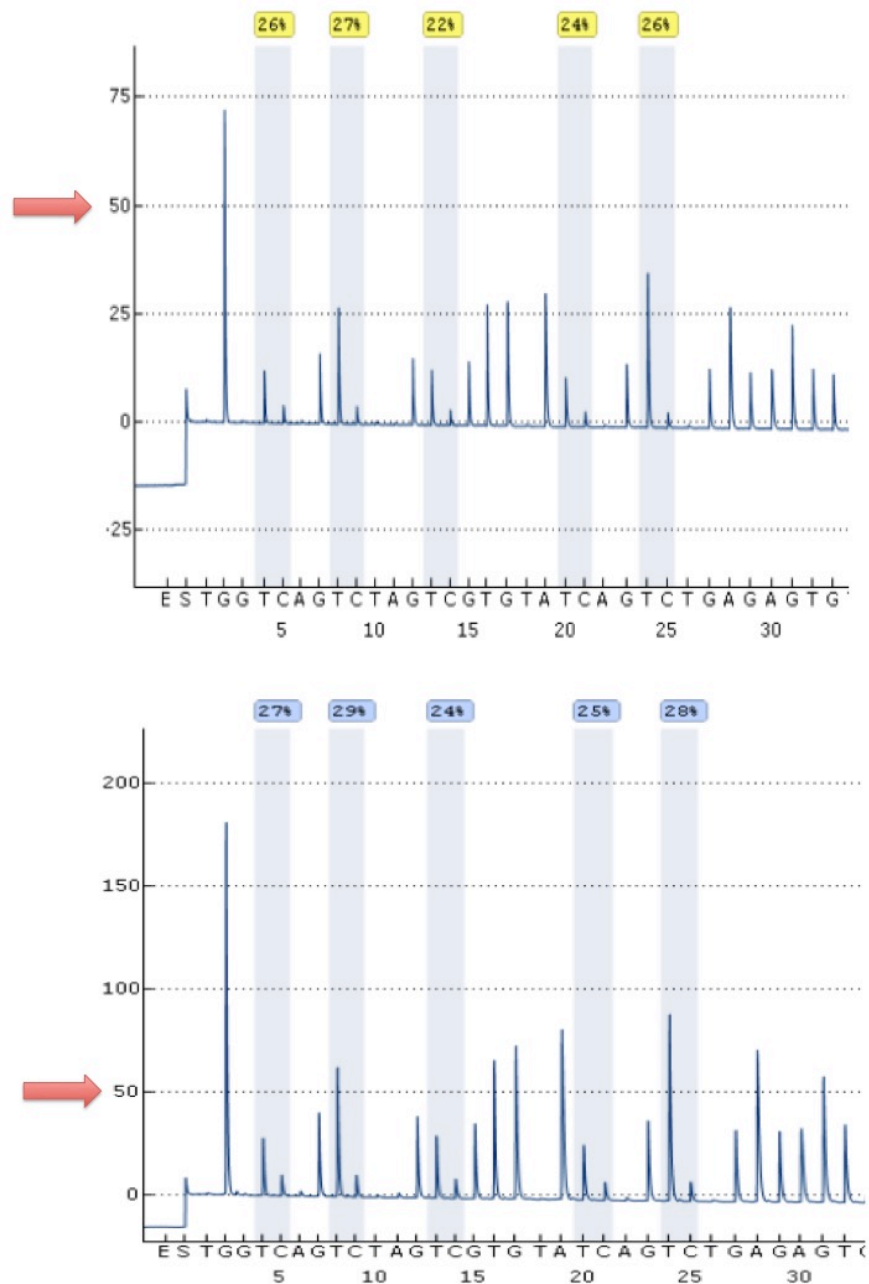


Abbildung 13: Pyrogramme des GNASAS-Locus oben: DNA gewonnen aus Trockenblut; unten: DNA gewonnen aus EDTA-Blut. Die roten Pfeile verdeutlichen die geringe Lichtsignalintensität bei der DNA extrahiert aus dem Trockenblut einer Neugeborenen-Screeningkarte

#### **4.4. Überprüfung der Stabilität der DNA-Methylierung am *GNASAS*-Locus**

Die Untersuchung des imprinteten *GNASAS*-Locus erfolgte zur Überprüfung der Methodik, da sich imprintete Loci in ihrer DNA-Methylierung stabil zeigen. Es wurde die DNA-Methylierung der CpG-Positionen 1 bis 5 des Exons 1 des *GNASAS*-Gens anhand von 35 Probanden analysiert (Beispiel Pyrogramme siehe Abb. 13 S. 43)

##### **4.4.1. Stabilitätsanalyse anhand der durchschnittlichen DNA-Methylierung**

Zur Überprüfung der Stabilität der DNA-Methylierung über den Zeitraum von kurz nach der Geburt bis zur EDTA-Blutentnahme im späteren Kindes-, Jugend- oder frühen Erwachsenenalter wurden die durchschnittlichen DNA-Methylierungen des Abschnittes von CpG-Position 1 bis CpG-Position 5 beider Zeitpunkte miteinander verglichen. Für jeden Probanden wurde dazu aus den Methylierungsraten der CpG-Positionen 1 bis 5 ein Mittelwert errechnet. Dieser beschreibt die durchschnittliche DNA-Methylierung des untersuchten Abschnittes für den einzelnen Probanden.

Um die durchschnittliche DNA-Methylierung der beiden Zeitpunkte miteinander zu vergleichen, wurde sowohl für das Neugeborenenenscreening als auch für die EDTA-Blutuntersuchung ein Mittelwert der durchschnittlichen DNA-Methylierung aller 35 Probanden ermittelt. Zum Zeitpunkt des Neugeborenenenscreenings lag die durchschnittliche DNA-Methylierung aller Probanden für den Abschnitt von CpG-Position 1 bis 5 bei 25,02%  $\pm$ 3,466%. Im späteren Leben bei der EDTA-Blutuntersuchung lag die durchschnittliche DNA-Methylierung von allen Probanden bei 22,94%  $\pm$ 4,758% bei Betrachtung des gesamten Abschnittes von CpG-Position 1 bis 5. Es zeigte sich bei der Untersuchung der durchschnittlichen DNA-Methylierung auf signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten ein signifikanter Unterschied in der DNA-Methylierung von 2,08% (vgl. Abb. 14).

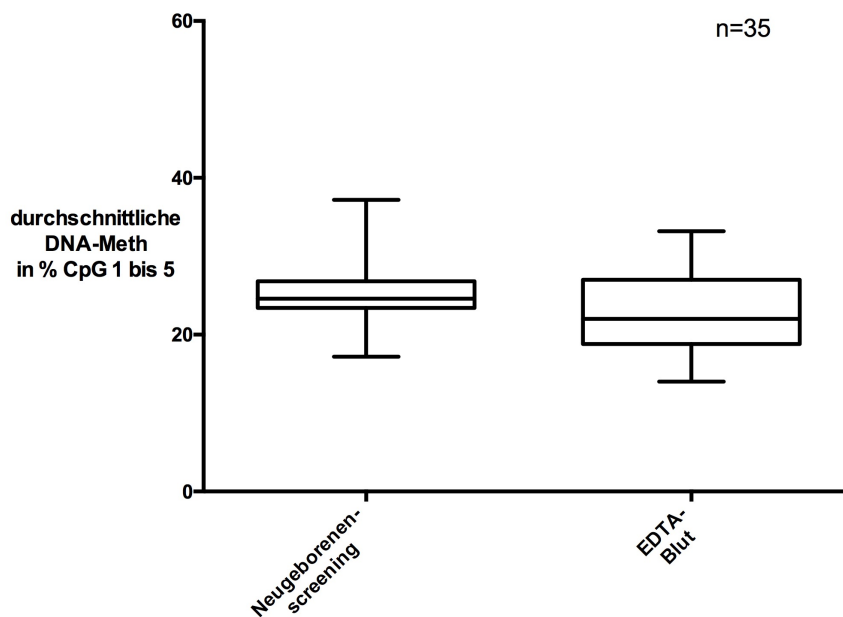


Abbildung 14: Whiskers-Boxplot der durchschnittlichen Methylierung des *GNASAS*-Locus zum Zeitpunkt des Neugeborenen-screensings und zum Zeitpunkt der EDTA-Blutentnahme

#### 4.4.2. Überprüfung der individuellen Stabilität am *GNASAS*-Locus

Zur weiteren Untersuchung der Stabilität innerhalb der frühen Lebensjahre wurden die individuellen DNA-Methylierungsgrade betrachtet. Dazu wurde für jeden Probanden die durchschnittliche DNA-Methylierung des Abschnittes von CpG-Position 1 bis 5 in dem Trockenblut der Neugeborenen-screensingarten mit der durchschnittlichen DNA-Methylierung des Abschnittes von CpG-Position 1 bis 5 in der EDTA-Blutuntersuchung korreliert. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation mit einem positiven Pearsons Korrelationskoeffizient von 0,38 (vgl. Abb. 15).

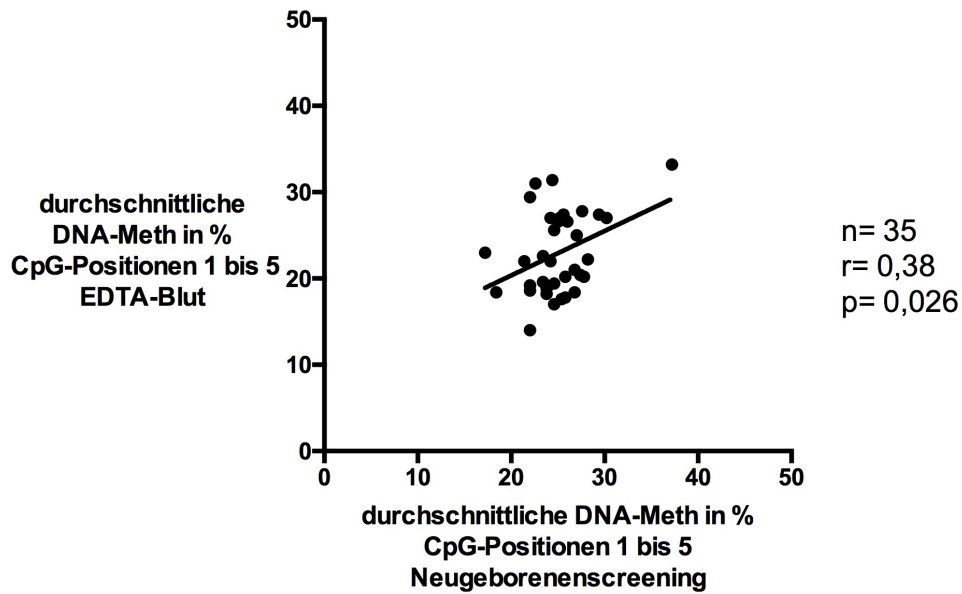


Abbildung 15: Korrelation der durchschnittlichen DNA-Methylierung zum Zeitpunkt des Neugeborenencreenings mit der durchschnittlichen DNA-Methylierung zum Zeitpunkt der EDTA-Blutentnahme für den *GNASAS*-Locus

Zusammenfassend zeigte die Untersuchung der DNA-Methylierung am *GNASAS*-Locus über den Zeitraum von kurz nach der Geburt bis ins spätere Kindes-, Jugend- oder frühe Erwachsenenalter eine stabile DNA-Methylierung bei Betrachtung der individuellen Stabilität. Der detektierte Unterschied in der durchschnittlichen DNA-Methylierung zeigte sich sehr gering.

#### 4.5. Untersuchung der Stabilität am *POMC* Intron2/Exon3-Übergang

Nachdem die Pyrosequenzierung einer DNA gewonnen aus dem Trockenblut einer Neugeborenencreeningkarte etabliert worden war und die Methodik anhand des *GNASAS*-Locus überprüft worden war, erfolgte die Stabilitätsanalyse des *POMC* Intron2/Exon3-Übergangs.

##### 4.5.1. Pyrosequenzierung des *POMC* Intron2/Exon3-Übergangs

Am *POMC* Intron2/Exon3-Übergang wurden die beiden letzten CpG-Positionen des Introns 2 (CpG-Positionen -2 und -1) sowie die ersten fünf CpG-Positionen des Exons 3 (CpG-Positionen 1, 2, 3, 4 und 5) analysiert. Es erfolgte die Untersuchung an 55 Probanden. In den Pyrogrammen der Pyrosequenzierung zeigte sich am *POMC*-Locus ebenfalls ein deutlich geringeres Lichtsignal für die Analysen der DNA gewonnen aus dem Trockenblut des Neugeborenencreenings im Vergleich zu der DNA gewonnen

aus dem EDTA-Blut (vgl. Abb. 16 die blauen Pfeile verdeutlichen die unterschiedliche Intensität des detektierten Lichtsignals)

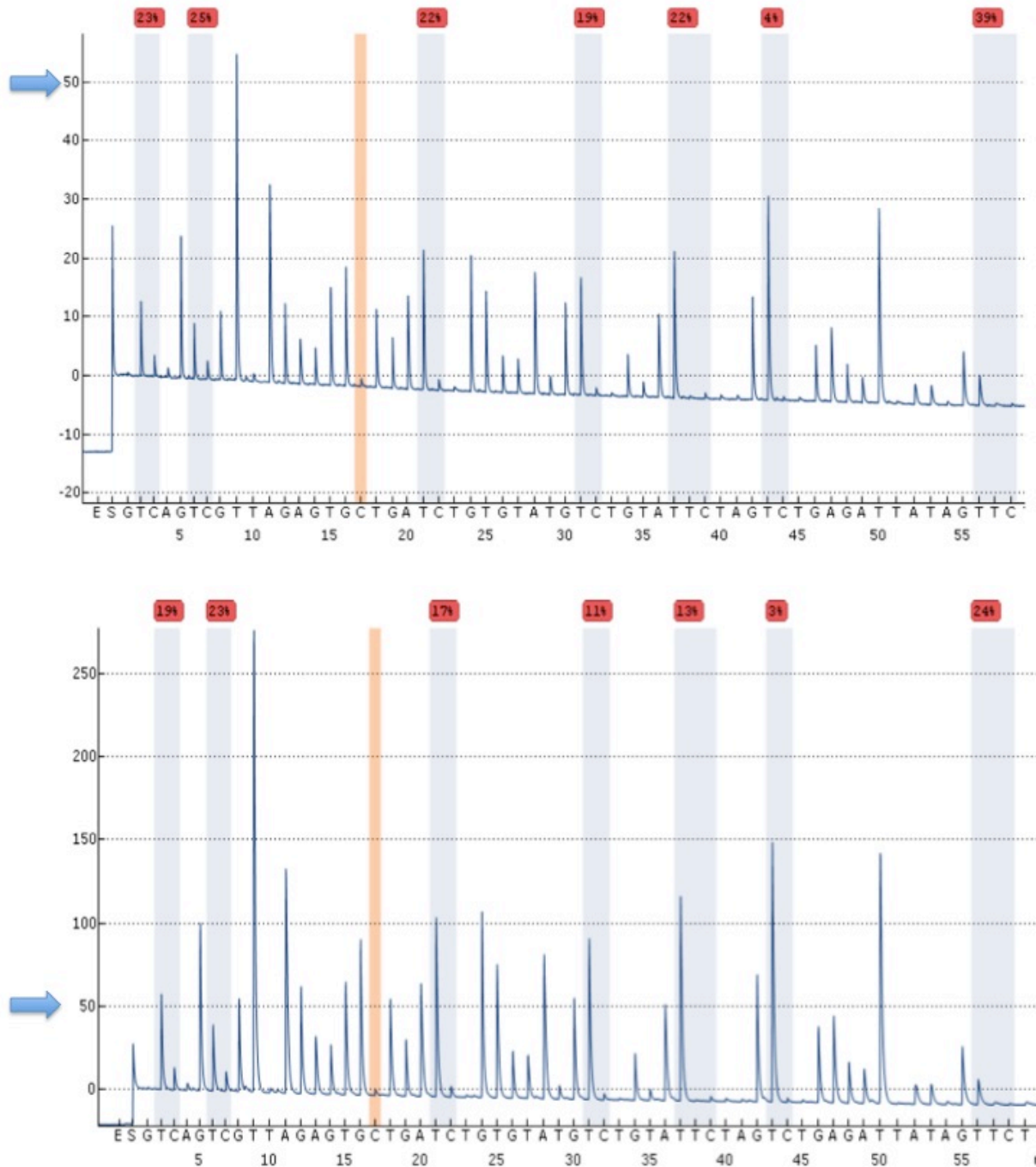


Abbildung 16: Pyrogramme des *POMC*-Locus: oben: DNA gewonnen aus Trockenblut; unten: DNA gewonnen aus EDTA-Blut, die Pfeile zeigen die unterschiedlich hohen detektierten Lichtintensitäten

## 4.5.2. Stabilitätsanalyse des gesamten Abschnittes des *POMC*-Locus

### 4.5.2.1. Stabilitätsanalyse anhand der durchschnittlichen DNA-Methylierung

Zur Überprüfung der Stabilität der DNA-Methylierung über den Zeitraum von kurz nach der Geburt bis zur EDTA-Blutentnahme im späteren Kindes-, Jugend- oder frühen Erwachsenenalter wurde die durchschnittliche DNA-Methylierung des Abschnittes von CpG-Position -2 bis CpG-Position 5 der beiden Zeitpunkte miteinander verglichen. Für jeden Probanden wurde dazu aus den Methylierungsraten der einzelnen CpG-Positionen -2,-1,1,2,3,4 und 5 ein Mittelwert gebildet, der die durchschnittliche Methylierung des untersuchten Abschnittes beschreibt. Es wurde anschließend für beide Zeitpunkte die durchschnittliche DNA-Methylierung des Abschnittes für alle 55 Probanden ermittelt.

Die durchschnittliche DNA-Methylierung des Abschnitts aller Probanden betrug zum Zeitpunkt des Neugeborenen Screenings  $31,52\% \pm 5,568\%$ . Im späteren Leben bei der EDTA-Blutuntersuchung zeigte die Gesamtheit aller Probanden eine durchschnittliche DNA-Methylierung des Abschnittes von  $30,63\% \pm 5,585\%$  (vgl. Abb. 17).

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich der durchschnittlichen DNA-Methylierung der beiden Zeitpunkte.

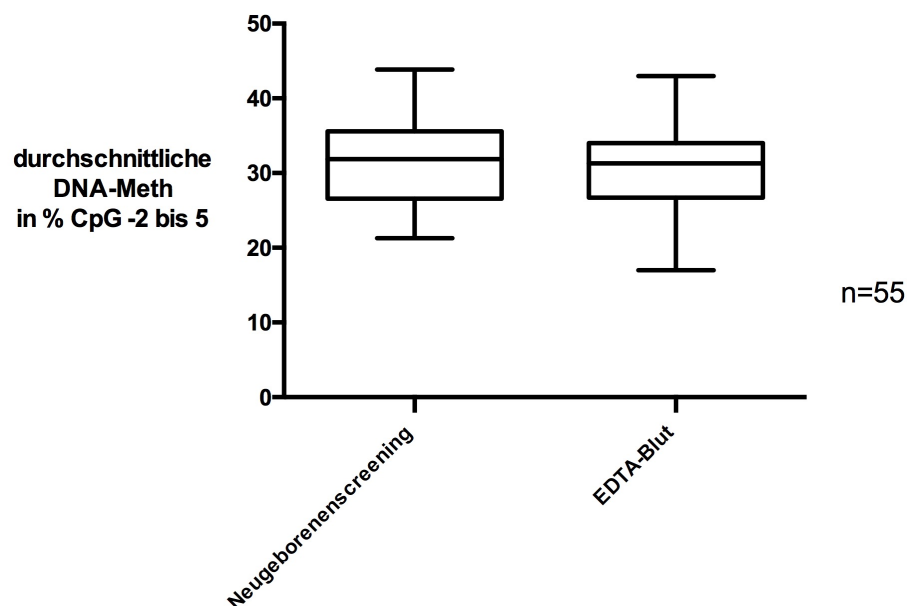


Abbildung 17: Whiskers-Boxplot der durchschnittlichen Methylierung des *POMC*-Locus zum Zeitpunkt des Neugeborenen Screenings und zum Zeitpunkt der EDTA-Blutentnahme

#### 4.5.2.2. Untersuchung der individuellen Stabilität am *POMC*-Locus

Zur weiteren Untersuchung der Stabilität über die Zeit wurde die individuelle DNA-Methylierung betrachtet. Es wurde für jeden Probanden die durchschnittliche DNA-Methylierung von CpG-Position -2 bis 5 zum Zeitpunkt des Neugeborenen Screenings mit der durchschnittlichen DNA-Methylierung zum Zeitpunkt der EDTA-Blutentnahme korreliert. Es zeigte sich dabei eine signifikante Korrelation mit einem positiven Pearsons Korrelationskoeffizient von 0,509 (vgl. Abb. 18).

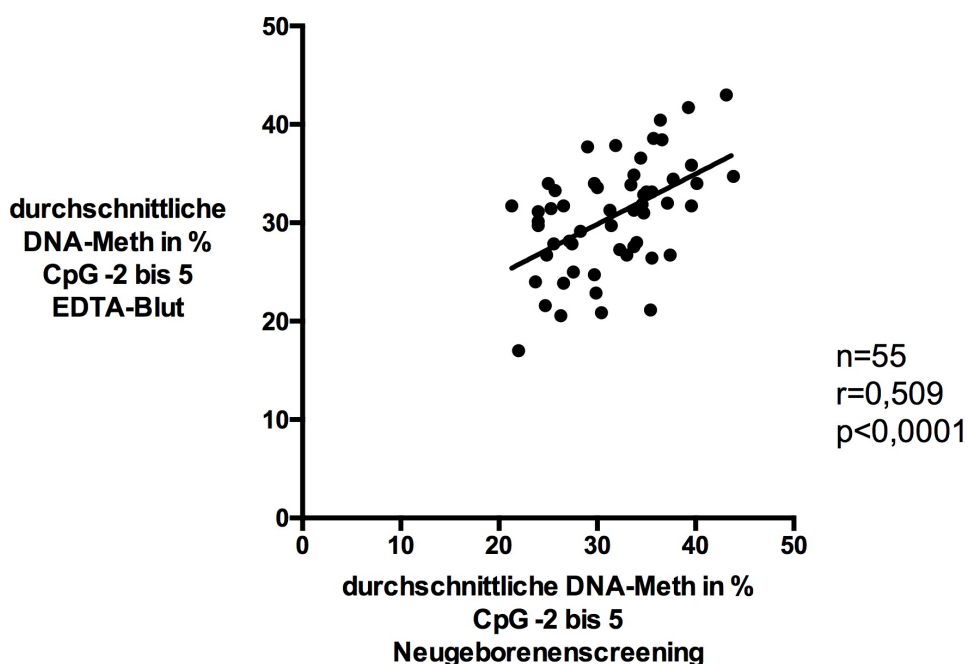


Abbildung 18: Korrelation der durchschnittlichen DNA-Methylierung zum Zeitpunkt des Neugeborenen Screenings mit der durchschnittlichen DNA-Methylierung zum Zeitpunkt der EDTA-Blutentnahme für den *POMC*-Locus\*

Zusammenfassend lässt sich für die durchschnittliche DNA-Methylierung von CpG-Position -2 bis 5 des *POMC*-Locus ein stabiles Methylierungsverhalten vom Zeitpunkt des Neugeborenen Screenings bis ins spätere Leben feststellen.

#### 4.5.3. Überprüfung der individuellen Stabilität an den einzelnen CpG-Positionen

Zur weiteren Untersuchung der Stabilität der DNA-Methylierung im *POMC*-Locus wurden die einzelnen CpG-Positionen -2 bis 5 untersucht. Dazu wurde die DNA-

\* Angelehnt an [85] Abb. 2C dort publiziert mit n=52

Methylierung eines jeden Probanden zum Zeitpunkt des Neugeborenen Screenings mit der DNA-Methylierung zum Zeitpunkt der EDTA-Blutentnahme verglichen.

Es zeigte sich für die CpG-Position -2 eine positive Korrelation mit einem Pearsons Korrelationsfaktor von 0,62. Für die CpG-Position -1 zeigte sich ebenfalls eine positive Korrelation mit einem Pearsons Korrelationsfaktor von 0,64. An der CpG-Position 1 ließ sich ebenfalls eine positive Korrelation nachweisen. Der Pearsons Korrelationsfaktor betrug 0,57 für die CpG-Position 1. Für die CpG-Position 2 konnte keine Korrelation nachgewiesen werden (s. Abb. 19).

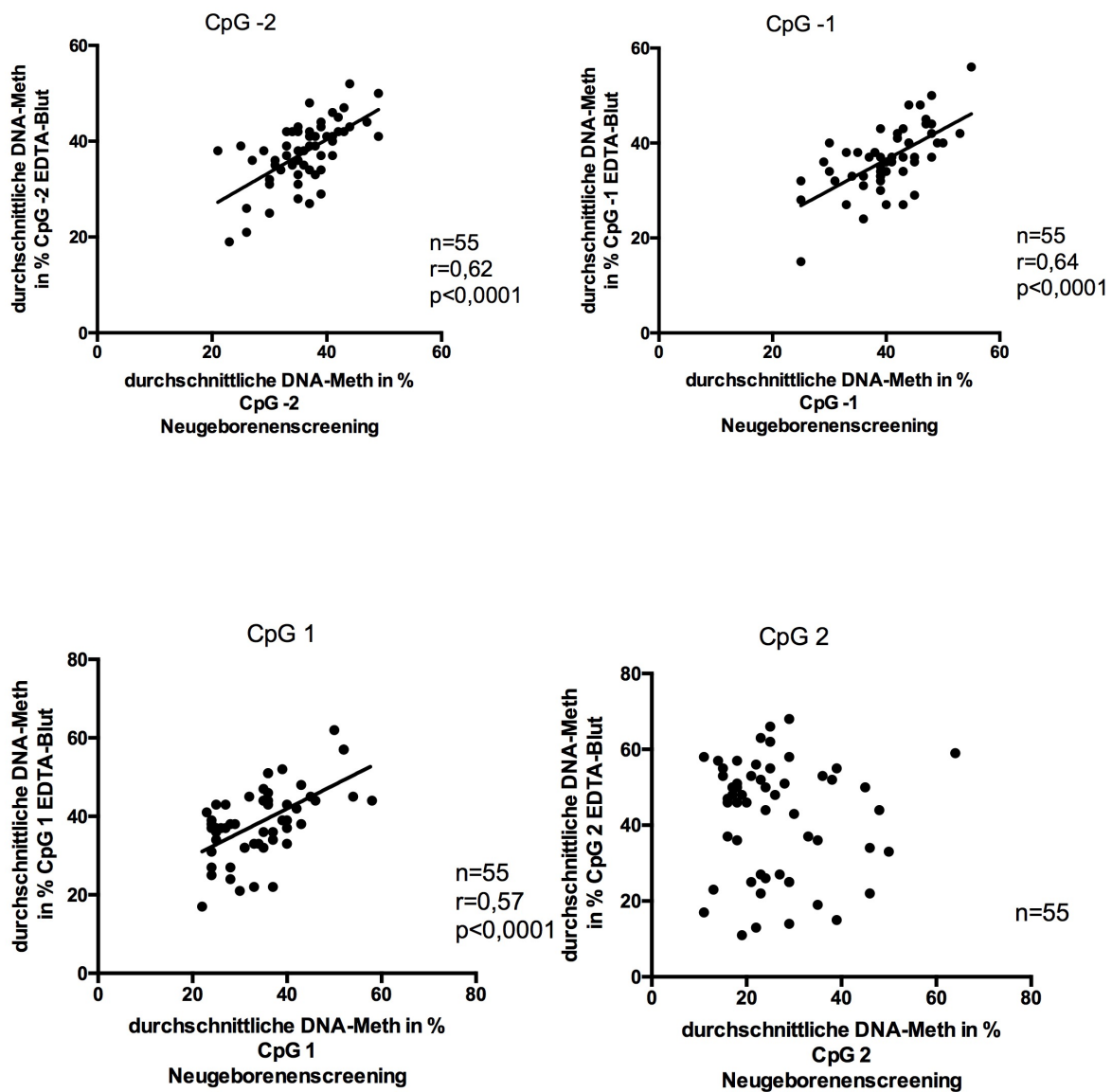


Abbildung 19: Korrelation der DNA-Methylierung für die CpG-Positionen -2,-1,1 und 2



Für die CpG-Position 3 ließ sich keine signifikante Korrelation nachweisen. Es zeigte sich aber ein Trend einer positiven Korrelation ( $p=0,051$ ). Die CpG-Position 4 zeigte eine positive Korrelation mit einem Pearsons Korrelationsfaktor von 0,42. Für die CpG-Position 5 war keine Korrelation nachweisbar (s. Abb. 20).

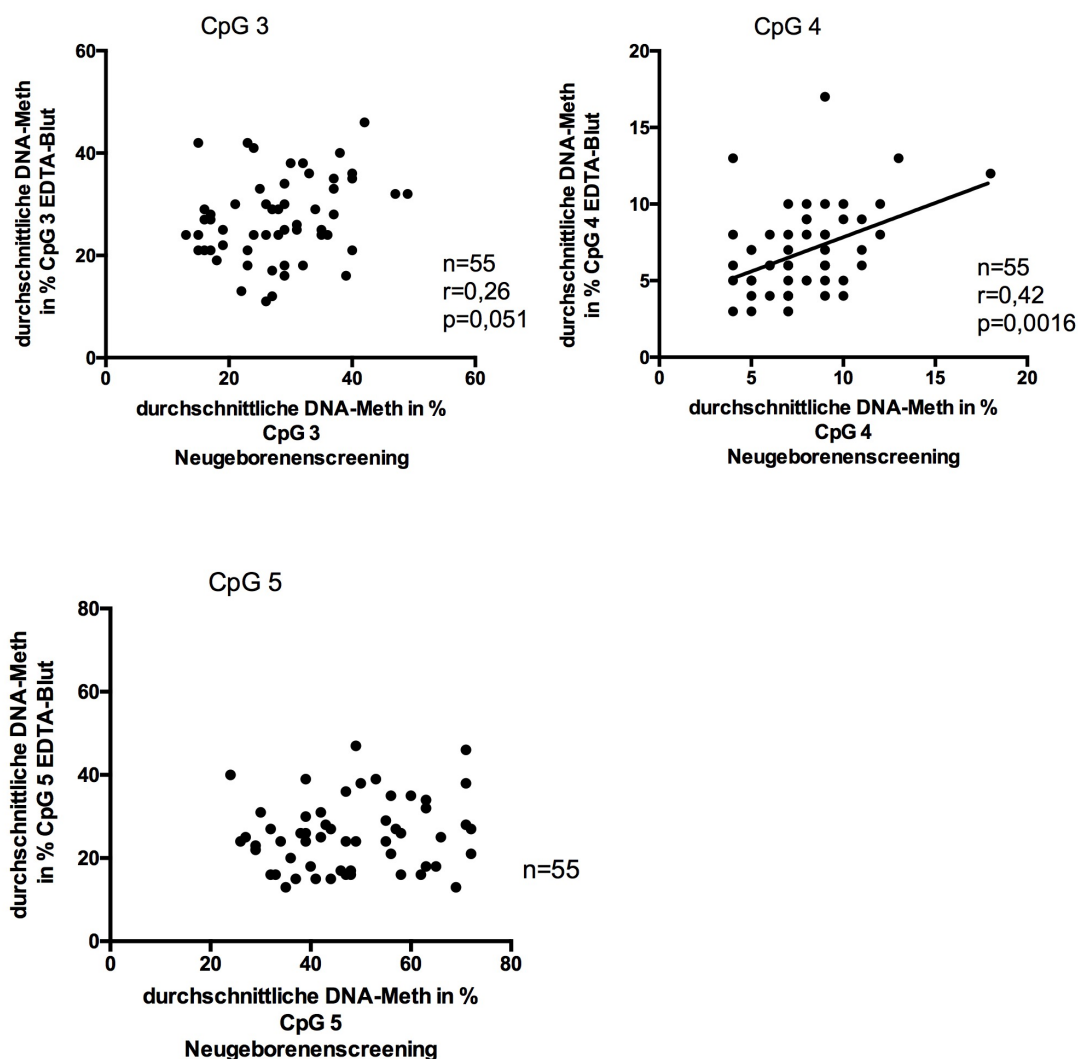


Abbildung 20: Korrelation der DNA-Methylierung für die CpG-Positionen 3, 4 und 5

Zusammenfassend zeigte sich bei der Untersuchung der individuellen Stabilität der DNA-Methylierung der einzelnen CpG-Positionen an den CpG-Positionen -2, -1, 1 und 4 eine signifikante Korrelation und somit ein stabiles Methylierungsverhalten. Es zeigt

sich außerdem, dass die DNA-Methylierung interindividuell an den einzelnen CpG-Positionen variiert.

#### 4.6. Assoziation zwischen der DNA-Methylierung und dem BMI-SDS

Bei stabiler DNA-Methylierung sollte untersucht werden, ob der BMI-SDS im späteren Leben mit der DNA-Methylierung zum Zeitpunkt des Neugeborenen Screenings assoziiert ist und somit anhand der DNA-Methylierung eine Aussage über die spätere Gewichtsentwicklung getroffen werden kann.

Es wurde die durchschnittliche DNA-Methylierung der CpG-Positionen -2, -1, 1 und 4 zum Zeitpunkt des Neugeborenen Screenings ermittelt, da diese sich bei der individuellen Stabilitätsanalyse als stabil gezeigt hatten. Es erfolgte die Korrelation des BMI-SDS mit der durchschnittlichen DNA-Methylierung der vier stabilen CpG-Positionen. Dort zeigte sich kein signifikantes Ergebnis (s. Abb. 21).

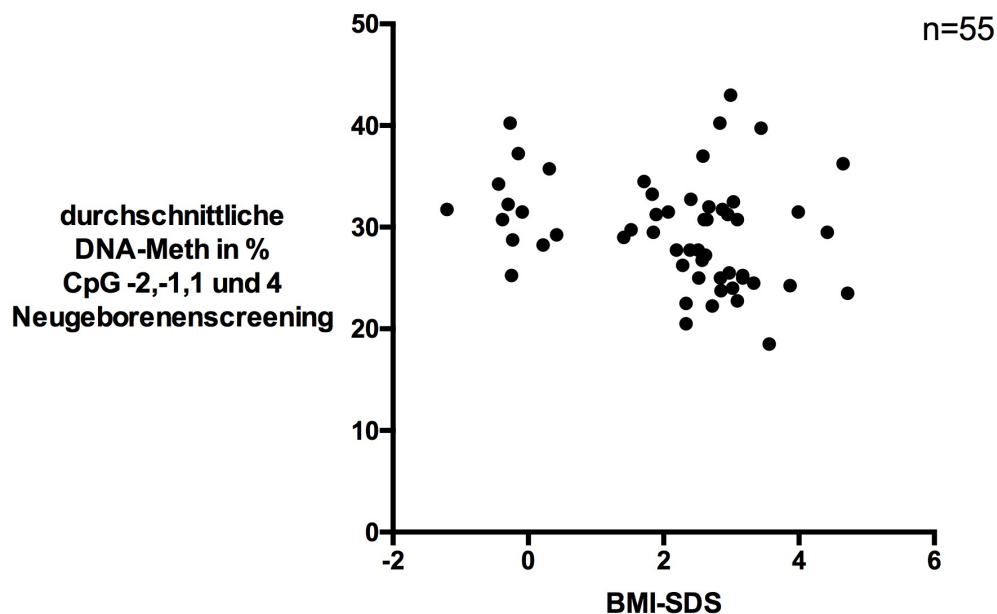


Abbildung 21: Korrelation des BMI-SDS mit der durchschnittlichen Methylierung der stabilen CpG-Positionen -2,-1,1 und 4 zum Zeitpunkt des Neugeborenen Screenings

Es konnte keine Assoziation zwischen der DNA-Methylierung zum Zeitpunkt des Neugeborenen Screenings und dem BMI-SDS gezeigt werden.

#### 4.7. Einfluss des Alters auf die DNA-Methylierung

Es wurde eine eindeutige Stabilität der DNA-Methylierung des *POMC*-Locus dargestellt. In Querschnittsstudien hatte sich gezeigt, dass monozygote Zwillingspaare im Alter epigenetisch verschiedener sind. Dieses Phänomen wird als „epigenetic drift“ bezeichnet. Das Alter der Probanden bei EDTA-Blutentnahme variierte. Somit konnte zusätzlich überprüft werden, ob sich trotz der epigenetischen Stabilität am *POMC*-Locus ein Einfluss des Alters auf die DNA-Methylierung darstellt. Es wurde dazu das Alter bei EDTA-Blutentnahme mit der durchschnittlichen DNA-Methylierung im EDTA-Blut korreliert. Es zeigte sich dabei keine Korrelation (s. Abb. 22).

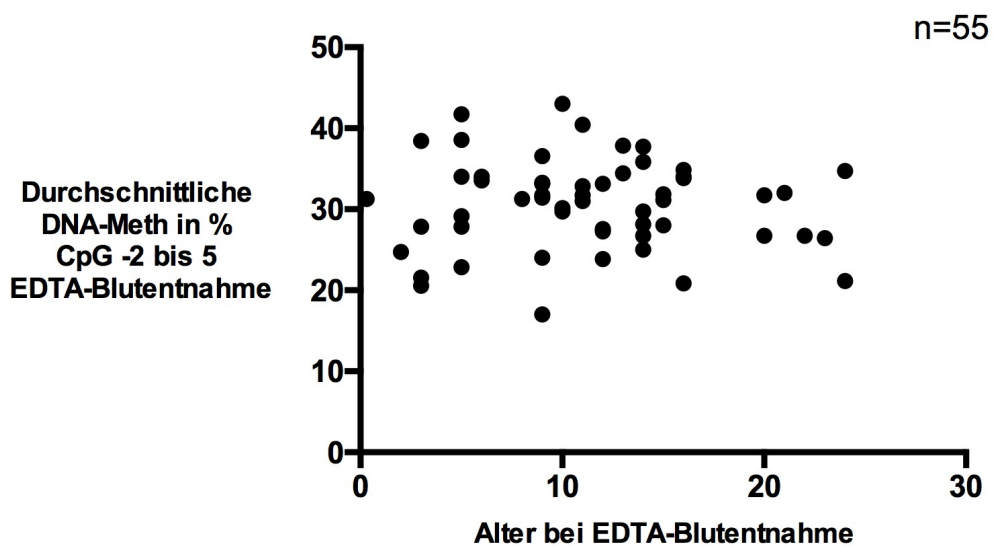


Abbildung 22: Korrelation des Alters bei EDTA-Blutentnahme mit der durchschnittlichen Methylierung von CpG-Position -2 bis 5

Es konnte für den *POMC*-Locus kein Einfluss des Alters auf die DNA-Methylierung gezeigt werden.

## 5. Diskussion

### 5.1. Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse

In Familien- und Zwillingsstudien konnte ein hoher genetischer Einfluss auf die Entstehung von Übergewicht und Adipositas gezeigt werden [18]. Dieser ließ sich im Rahmen von monogenetischen Untersuchungen sowie genomweiten Assoziationsstudien nicht ausreichend erklären. Es wurde daher versucht epigenetische Modifikationen zu identifizieren, die durch ihren Einfluss auf die Genexpression eine Rolle in der Adipositasentstehung spielen könnten. Dabei wurde vor allem die DNA-Methylierung als epigenetische Modifikation betrachtet. In Studien zur epigenetischen Stabilität wurde gezeigt, dass es Genloci gibt, an denen sich die DNA-Methylierung im Laufe des Lebens verändert [59, 61, 65] und dass es Genloci gibt, deren DNA-Methylierungsmuster über lange Zeit stabil bleibt [58, 59, 79]. Nachdem erste Assoziationen zwischen dem BMI und der DNA-Methylierung aufgeschlüsselt worden waren [59, 81], wurde von Wissenschaftlern des Institutes für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie eine Kandidatengenstudie am *POMC*-Gen durchgeführt. Es zeigte sich bei übergewichtigen Kindern und Jugendlichen eine vermehrte DNA-Methylierung am *POMC* Intron2/Exon3-Übergang [83]. Diese Assoziation stand im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Assoziationen zwischen Körpergewicht und DNA-Methylierung [59, 81] nicht im Zusammenhang mit SNPs. Im Rahmen dieser Dissertation sollte untersucht werden, ob die DNA-Methylierung am *POMC* Intron2/Exon3-Übergang stabil ist.

Dazu sollte die DNA-Methylierung mittels Pyrosequenzierung zum Zeitpunkt der Geburt und zu einem zweiten Zeitpunkt im späteren Kindes-, Jugend- oder frühen Erwachsenenalter untersucht und anschließend verglichen werden. Die DNA-Methylierung zum Zeitpunkt der Geburt sollte anhand von DNA extrahiert aus dem Trockenblut einer U2-Neugeborenencreeningkarte untersucht werden. Das U2-Neugeborenencreening wird in Deutschland zwischen der 36. und 72. Lebensstunde durchgeführt. Dabei werden einige Tropfen Blut aus der Vene oder kapillär aus der Ferse des Neugeborenen auf eine Filterpapierkarte getropft. Für die Untersuchung der DNA-Methylierung im späteren Kindes-, Jugend- oder frühen Erwachsenenalter sollte EDTA-Blut verwendet werden.

Es sollte zunächst untersucht werden, ob die Analyse der DNA-Methylierung anhand von DNA-Material, das aus einer mehrere Jahre gelagerten U2-

Neugeborenencreeningkarte gewonnen wurde, überhaupt möglich ist. Nach der Etablierung der Analyse der DNA-Methylierung mittels Pyrosequenzierung in Trockenblut einer Neugeborenencreeningkarte sollte die Methodik zunächst an einem als stabil geltenden Locus überprüft werden. Dafür sollte am imprinteten *GNASAS*-Locus die DNA-Methylierung bei Geburt mit der DNA-Methylierung zu einem späteren Zeitpunkt verglichen werden. Am *POMC*-Locus sollte ebenfalls die Stabilität der DNA-Methylierung vom Zeitpunkt des Neugeborenencreenings bis zum Zeitpunkt der EDTA-Blutentnahme untersucht werden. Sofern sich die DNA-Methylierung am *POMC*-Locus stabil zeigen sollte, sollte auf einen Zusammenhang zwischen der DNA-Methylierung bei Geburt und dem BMI geprüft werden. Außerdem sollte der Einfluss des Alters auf die DNA-Methylierung untersucht werden.

Da diese Methode erstmalig angewendet wurde, musste zunächst eine Pyrosequenzierung für DNA-Proben, die aus dem Trockenblut einer Neugeborenencreeningkarte isoliert worden war, etabliert werden. Die Menge an verfügbarem Trockenblut war sehr gering. Aufgrund einer zu niedrigen DNA-Menge nach DNA-Extraktion konnten einige ursprünglich rekrutierte Probanden nicht in die Studie eingeschlossen werden. Es stellte sich heraus, dass die DNA-Extraktion eine Mindestmenge von 2,8ng ergeben musste, um ein für die Pyrosequenzierung einsetzbares Produkt nach der Polymerasekettenreaktion zu erhalten. Es wurde gezeigt, dass eine Pyrosequenzierung der DNA gewonnen aus Trockenblut bei ausreichender DNA-Menge grundsätzlich möglich ist. Das bei der Pyrosequenzierung detektierte Lichtsignal fiel bei der Sequenzierung der DNA des Trockenblutes jedoch geringer aus als bei der DNA des EDTA-Bluts.

Anschließend wurde die Vergleichbarkeit der beiden Materialien Trockenblut und EDTA-Blut überprüft. Es konnte anhand von zwei Testprobanden nachgewiesen werden, dass die Analyse der DNA-Methylierung mittels Pyrosequenzierung in beiden Materialien vergleichbar ist.

Zur Validierung der Methodik wurde zunächst die Stabilität eines DNA-Locus untersucht, der als stabil gilt. Es wurde dazu der *GNASAS*-Locus ausgewählt. Der *GNASAS*-Locus ist paternal imprintet. Das Imprinting wird früh in der embryonalen Entwicklung etabliert und zeigt sich stabil im weiteren Leben [55]. Außerdem zeigte der Locus in einer Studie zur Stabilität der DNA-Methylierung, dass ältere monozygote Zwillingspaare, die sich im Rahmen dieser Studie an vielen untersuchten Loci als

epigenetisch unterschiedlicher darstellten als jüngere monozygote Zwillingspaare, im *GNASAS*-Locus nicht verschiedener waren. Die longitudinale Beobachtung monozygoter Zwillinge über 10 Jahre zeigte keine Zunahme der interindividuellen Variabilität der DNA-Methylierung im *GNASAS*-Locus [62].

In der Analyse der Stabilität des *GNASAS*-Locus an 35 Probanden konnte ein stabiles DNA-Methylierungsmuster bestätigt werden. Es wurde zunächst die durchschnittliche DNA-Methylierung aller Probanden für den gesamten Abschnitt von CpG-Position 1 bis CpG-Position 5 betrachtet. In dem Vergleich der durchschnittlichen Methylierung zum Zeitpunkt des Neugeborenen Screenings mit der durchschnittlichen Methylierung zum Zeitpunkt der EDTA-Blutentnahme zeigte sich ein minimaler Unterschied von 2,08%. Eine frühere Studie, die nach altersassoziierten unterschiedlich methylierten Regionen gesucht hat, hat erst Methylierungsunterschiede von >20% als relevant gewertet [64]. Der detektierte Unterschied von 2,08% ist im Vergleich nur sehr gering und weist daher auf eine Stabilität der DNA-Methylierung im *GNASAS*-Locus hin.

Es wurde neben der Stabilität der durchschnittlichen DNA-Methylierung aller Probanden auch die individuelle Stabilität untersucht. Dazu erfolgte für jeden Probanden die Korrelation der durchschnittlichen DNA-Methylierung zum Zeitpunkt des Neugeborenen Screenings mit der durchschnittlichen DNA-Methylierung bei EDTA-Blutentnahme. Dabei zeigte sich eine positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,38, die ebenfalls eine Stabilität in der DNA-Methylierung des *GNASAS*-Locus aufzeigt. Insgesamt konnte anhand der Untersuchung des *GNASAS*-Locus die Methodik validiert werden.

Die Untersuchung der Stabilität des *POMC* Intron2/Exon3-Übergangs erfolgte an 55 Probanden. Es wurde zunächst die durchschnittliche DNA-Methylierung aller Probanden für den gesamten Abschnitt von CpG-Position -2 bis CpG-Position 5 betrachtet. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der durchschnittlichen DNA-Methylierung zum Zeitpunkt des Neugeborenen Screenings und der durchschnittlichen DNA-Methylierung zum Zeitpunkt der EDTA-Blutentnahme.

Es wurde anschließend die individuelle Stabilität des gesamten Abschnitts von CpG-Position -2 bis CpG-Position 5 analysiert. Dazu erfolgte für jeden Probanden die Korrelation der durchschnittlichen DNA-Methylierung zum Zeitpunkt des Neugeborenen Screenings mit der durchschnittlichen DNA-Methylierung zum Zeitpunkt der EDTA-Blutentnahme. Es zeigte sich auch bei individueller Betrachtung ein stabiles

DNA-Methylierungsverhalten. Der Pearsons Korrelationskoeffizient von 0,509 weist auf eine deutliche Stabilität hin.

Es erfolgte am *POMC*-Locus zusätzlich die Untersuchung der individuellen Stabilität der einzelnen CpG-Positionen. Es wurde für jede CpG-Position die individuelle DNA-Methylierung zum Zeitpunkt des Neugeborenen Screenings mit der individuellen DNA-Methylierung zum Zeitpunkt der EDTA-Blutentnahme verglichen. Dabei zeigte sich an den CpG-Positionen -2, -1, 1 und 4 eine signifikant positive Korrelation, die auf ein stabiles DNA-Methylierungsverhalten hinweist. An den CpG-Positionen 2 und 5 konnte keine Korrelation und somit kein Hinweis auf Stabilität festgestellt werden. Die CpG-Position 3 zeigt keine signifikante positive Korrelation, aber einen Trend zu einer positiven Korrelation.

Zusammenfassend konnte am *POMC* Intron2/Exon3-Übergang eine hohe Stabilität der DNA-Methylierung nachgewiesen werden. Neben der Stabilität zeigte sich zusätzlich eine interindividuelle Variabilität. Bei Betrachtung der Korrelationsgraphen für die individuelle Stabilität zeigte sich, dass die durchschnittliche DNA-Methylierung interindividuell variieren kann. Dies zeigte sich sowohl in der Betrachtung des gesamten Abschnitts als auch an den einzelnen CpG-Positionen.

Nachdem die Stabilität des *POMC*-Locus gezeigt worden war, wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der DNA-Methylierung bei Geburt und dem BMI besteht. Dazu erfolgte die Korrelation der durchschnittlichen DNA-Methylierung der stabilen CpG-Positionen -2,-1,1 und 4 mit dem BMI-SDS im späteren Leben. Dabei konnte keine Korrelation dargestellt werden. Es kann anhand dieser Daten keine Assoziation zwischen der DNA-Methylierung bei Geburt und dem BMI hergestellt werden.

Die Hypermethylierung des Exon 3 im *POMC*-Gen, die sich bei übergewichtigen Jugendlichen gezeigt hatte [83], konnte in Erwachsenen ebenfalls reproduziert werden [85]. In Zusammenschau mit der in dieser Dissertation ermittelten Stabilität des *POMC*-Locus, wäre eine Korrelation des BMI-SDS mit der DNA-Methylierung der stabilen CpG-Positionen zu erwarten gewesen. Die fehlende Korrelation lässt sich am wahrscheinlichsten durch die geringe Probandenzahl erklären. Nachdem von Kühnen et al. die Hypermethylierung des Exons 3 auch in Erwachsenen nachgewiesen werden konnte, erfolgte die Korrelation des BMI mit der DNA-Methylierung. Es wurde dabei eine viel größere Kohorte von 228 Probanden untersucht und es zeigte sich nur eine geringe Korrelation (Pearsons Korrelationskoeffizient  $r=0,18$ ) [85]. Eine so große Probandenzahl für die Untersuchung der DNA-Methylierung zum Zeitpunkt des

Neugeborenen Screenings konnte aufgrund einiger Limitationen in diesem Rahmen nicht erreicht werden, wäre aber für die Überprüfung des vermuteten Zusammenhangs notwendig.

Zuletzt wurde überprüft, ob das Alter einen Einfluss auf die DNA-Methylierung zeigt. Die Probanden waren bei EDTA-Blutentnahme unterschiedlich alt. Es wurde für den *POMC*-Locus die durchschnittlichen DNA-Methylierung bei EDTA-Blutentnahme mit dem Alter korreliert. Dabei zeigte sich keine Korrelation. In Querschnittsstudien hatte sich gezeigt, dass ältere monozygote Zwillinge größere Unterschiede in der DNA-Methylierung aufwiesen als jüngere, im Sinne eines „epigenetic drifts“. In dieser Untersuchung konnte kein Einfluss des Alters auf die DNA-Methylierung nachgewiesen werden.

## **5.2. Bezug der Ergebnisse auf die Frage nach einem potentiellen metastabilen Epiallel am *POMC*-Locus**

Ein metastabiles Epiallel beschreibt eine genomische DNA-Sequenz, die durch unterschiedliche epigenetische Konfigurationen zu phänotypischen Unterschieden führt. Ein bekanntes metastabiles Epiallel ist eine veränderte Form des *Agouti*-Gens der Maus: das *viable yellow agouti Allel* ( $A^{vy}$ ). Bei Hypomethylierung des inserierten Retrotransposons entwickeln die Mäuse Übergewicht und hellgelbes Fell. Metastabil bedeutet, dass diese epigenetischen Markierungen in der frühesten intrauterinen Entwicklung stochastisch gesetzt werden und anschließend stabil bleiben [67]. Es wurde zusätzlich gezeigt, dass der Anteil an C1-Metaboliten in der maternalen Nährstoffzufuhr zum Zeitpunkt der Konzeption die DNA-Methylierung beeinflussen kann [74]. Außerdem zeigten Studien, dass die epigenetische Modifikation teilweise über die elterliche Keimbahn vererbt werden kann [73].

Es konnte in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass der *POMC* Intron2/Exon3-Übergang die gleichen Charakteristika aufweist wie das  $A^{vy}$ -Gen. Eine Hypermethylierung im Bereich des Exon 3 ist mit einem erhöhten Körpergewicht assoziiert und der Methylierungsstatus des Exon 3 ist mit einem Transposon assoziiert [83]. Außerdem ist die DNA-Methylierung am *POMC*-Locus beeinflussbar durch die periconceptionelle Nährstoffaufnahme der Mutter und wird teilweise über die paternale Keimbahn vererbt [85]. Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die DNA-Methylierung am *POMC* Intron2/Exon3-Übergang interindividuell variabel, aber stabil ab dem Zeitpunkt der Geburt ist und daher früh in der Entwicklung etabliert wird.



Die Zusammenschau aller Arbeiten zeigt, dass es sich beim *POMC*-Locus um ein metastabiles Epiallel des Menschen handeln könnte.

### **5.3. Ergebnisse im aktuellen Vergleich**

Die Ergebnisse der Dissertation lassen sich mit anderen Studien zur epigenetischen Stabilität vergleichen. Die epigenetische Stabilität wurde sowohl in Quer- als auch Längsschnittstudien untersucht. Zuerst erfolgte der Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit Ergebnissen aus Längsschnittstudien, welche die epigenetische Stabilität von der Geburt bis ins spätere Lebensalter untersucht haben. Außerdem erfolgte ein Vergleich zu Längsschnittstudien, die einen variablen Zeitraum im Laufe des Lebens untersucht haben. Zuletzt erfolgte eine Gegenüberstellung der Ergebnisse dieser Arbeit mit Ergebnissen aus Querschnittstudien.

#### **5.3.1. Vergleich mit longitudinalen Studien mit Beginn bei Geburt**

Zum Vergleich eignen sich fünf Studien, die ebenfalls die Stabilität der DNA-Methylierung ab Geburt bis in das spätere Kindesalter in einer longitudinalen Untersuchung analysiert haben (Überblick siehe Tabelle 7). Die erste prospektive Studie zur epigenetischen Stabilität ab Geburt stammt von Wang et al. und untersuchte 105 Kinder. Es wurde das DNA-Methylierungsmuster des Nabelschnurblutes mit dem DNA-Methylierungsmuster venösen Blutes im Alter von sechs bis 24 Monaten verglichen. Mit dem Illumina HumanMethylation27 Bead Chip wurden >27.000 CpG-Positionen auf ihr longitudinales Methylierungsverhalten getestet. Es zeigten sich 159 CpG-Positionen bei den männlichen Probanden und 149 CpG-Positionen bei den weiblichen Probandinnen, die sich altersabhängig signifikant in ihrer DNA-Methylierung unterschieden. 98 CpG-Positionen zeigten sich in beiden Geschlechtern altersabhängig verschieden methyliert. Diese altersabhängigen CpG-Positionen waren zumeist mit Genen assoziiert, die eine Rolle in der Entwicklung und Funktion des hämatologischen Systems oder in der Immunfunktion und -antwort spielen [80].

Eine zweite Studie, welche die Stabilität des Epigenoms in einer Geburtskohorte untersucht hat, wurde von Martino et al. durchgeführt. Sie hat zehn monozygote und fünf heterozygote Zwillingspaare über einen Zeitraum von 18 Monaten untersucht. Es wurde dabei DNA aus Wangenschleimhaut gewonnen und mithilfe des Illumina Infinium Human Methylation 450 BeadChip das Methylierungsmuster untersucht. Dabei wurden >330.000 CpG-Positionen analysiert. In 30,1% der CpG-Positionen zeigte sich eine

signifikante Veränderung der DNA-Methylierung von durchschnittlich 3,1% pro Jahr. Um den Einfluss technischer Effekte zu minimieren, wurden nur CpG-Positionen mit einem Methylierungsunterschied von >20% als altersabhängig unterschiedlich methyliert definiert. Unter dem strikteren „Cut-off“ wiesen nur noch 0,8% der CpG-Positionen einen alterabhängigen Methylierungsunterschied auf. Dreiviertel der Gene, mit denen die altersabhängigen CpG-Positionen assoziiert wurden, waren in die Kategorien Entwicklung und Morphogenese einzuordnen [64].

Die Studien von Wang et al. und Martino et al. haben eine sehr große Anzahl an CpG-Positionen auf ihre longitudinale Stabilität überprüft. Beide Studien zeigen, dass nur eine sehr geringe Anzahl der CpG-Positionen ein dynamisches DNA-Methylierungsverhalten aufweist. Dies ist gut mit der detektierten Stabilität des *POMC*-Locus vereinbar.

In einer Studie von Murphy et al. wurde die Stabilität der DNA-Methylierung an sieben Loci, die zu imprinteten Genen gehörten, an 30 Probanden untersucht. Das DNA-Material wurde zum Zeitpunkt der Geburt aus Nabelschnurblut und Wangenschleimhaut gewonnen. Ein Jahr später wurde DNA-Material ebenfalls aus Wangenschleimhaut gewonnen. Alle Proben wurden mittels Pyrosequenzierung analysiert. Es zeigte sich, dass die meisten Probanden eine Stabilität in der DNA-Methylierung über den Zeitraum eines Jahres aufwiesen [86]. Im Vergleich zu den beiden vorher beschriebenen Studien erfolgte bei Murphy et al. genau wie in dieser Arbeit keine epigenomweite Analyse sondern eine gezielte Untersuchung bestimmter Loci. Der Untersuchungszeitraum von einem Jahr ist kürzer als in dieser Arbeit. Dennoch unterstützen die Resultate von Murphy et al. die Ergebnisse der epigenetischen Stabilität dieser Dissertation, insbesondere weil *GNASAS* ebenfalls imprinted ist und sich stabil über die Zeit zeigt.

Über einen Zeitraum von fünf Jahren untersuchte Acevedo et al. zehn gesunde Mädchen. Dabei wurde DNA aus Blutproben im Alter von 3, 6, 12, 24, 36, 48 und 60 Monaten gewonnen und mithilfe des HumanMethylation450 BeadChip analysiert. Die Analyse von 485.577 CpG-Positionen an sieben Zeitpunkten resultierte in 853 CpG-Positionen, die einen signifikanten Methylierungsunterschied aufwiesen, wovon in 476 CpG-Positionen der Methylierungsunterschied ausschließlich auf das Alter zurückzuführen war. Die altersabhängigen CpG-Positionen waren gehäuft mit Genen assoziiert, die mit der Entwicklung, der Morphogenese und dem Immunsystem assoziiert sind [66]. Der Nachteil der Untersuchung von Acevedo et al. ist, dass sie nur sehr wenige Probanden untersucht haben. Außerdem beginnt ihre Untersuchung im Gegensatz zu allen bisher

aufgeführten Studien und dieser Dissertation nicht direkt nach der Geburt, sondern erst im Alter von 3 Monaten.

Eine Geburtskohortenstudie zur Stabilität der DNA-Methylierung von Urdinguio et al. beobachtete 15 Probanden für fünf Jahre. Es wurden 485.577 CpG-Positionen mit dem HumanMethylation450 BeadChip in Nabelschnurblut und in venösem Blut im Alter von fünf Jahren untersucht. Es zeigten sich 6641 signifikant unterschiedlich methylierte CpG-Positionen. Die mit dem Alter hypermethylierten CpG-Positionen waren mit Genen, die eine Rolle in der Entwicklung spielen, assoziiert. Die nach fünf Jahren hypomethylierten CpG-Positionen zeigten Assoziationen zu Genen, die eine Rolle in der Immunfunktion spielen. Es konnten circa 44% der bei Acevedo et al. entdeckten dynamischen CpG-Positionen in dieser Studie reproduziert werden [87].

Die Studien von Acevedo et al. und Urdinguio et al. zeigten über einen Untersuchungszeitraum von fünf Jahren insgesamt nur eine geringe Anzahl an dynamischen CpG-Positionen. Bei Acevedo et al. sind 0,18% und bei Urdinguio et al. 1,37% der untersuchten CpG-Positionen altersabhängig verschieden methyliert.

Zusammenfassend zeigte sich in den longitudinalen Geburtskohortenstudien prozentual nur an wenigen CpG-Positionen ein dynamisches Methylierungsverhalten, was gut mit der in dieser Arbeit detektierten epigenetischen Stabilität des *POMC*-Locus vereinbar ist.

**Tabelle 7: Übersicht Geburtskohortenstudien zur Stabilität der DNA-Methylierung**

<b>Author</b>	<b>Jahr</b>	<b>Kohorte/ untersuchtes Material</b>	<b>Zeit-raum</b>	<b>Ergebnis</b>
Wang et al. [80]	2012	105 Kinder (59 ♂, 46 ♀), >27.000 CpGs: Geburt: Nabelschnurblut, ven. Blut mit 6-24 Monaten	2 Jahre	♂ 159 & ♀ 149 dynamische CpGs, 98 ♂&♀, assoziierte Genkategorien: Immun- und Hämatologisches System
Martino et al.[64]	2013	10 monozygote & 5 dizygote Zwillingspaare, >330.000 CpGs: Wangenschleimhaut	1,5 Jahre	0,8% signifikant verändert methyliert assoziierte Genkategorien: Entwicklung, Morphogenese
Murphy et al.[86]	2012	30 Probanden, 7 Loci: Nabelschnurblut, Wangenschleimhaut bei Geburt + 12 Monate	1 Jahr	Großteil stabil
Acevedo et al.[66]	2015	10 Mädchen, 485577 CpGs: Blut mit 3,6,12,24,36,48,60 Monaten	5 Jahre	853 CpGs mit signifikantem Methylierungsunterschied; assoziierte Genkategorien: Entwicklung, Morphogenese, Immunfunktion
Urduingio et al.[66, 87]	2016	15 Probanden, 485577 CpGs: Nabelschnurblut bei Geburt, venöses Blut mit 5 Jahren	5 Jahre	6641 CpGs mit signifikantem Methylierungsunterschied, 36,79% hypermethyliert + assoziiert mit Entwicklung, 63,21% hypomethyliert + assoziiert mit Immunfunktion

### **5.3.2. Vergleich der Ergebnisse mit longitudinalen Studien mit variablen Beginn**

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden außerdem mit Längsschnittstudien zur epigenetischen Stabilität verglichen, die einen beliebigen longitudinalen Zeitraum untersucht haben (Überblick s. Tabelle 8). Bjornsson et al. analysierten 2008 die genomweite DNA-Methylierung mittels LUMA-Technologie in zwei verschiedenen Studienpopulationen. In beiden Populationen veränderte sich die genomweite DNA-Methylierung in 8-10% der Probanden um mehr als 20% über einen Zeitraum von 11-16 Jahren. Bei 40-60% der Probanden zeigte sich nur eine sehr geringe Veränderung der Methylierung von maximal 5% innerhalb des untersuchten Zeitraums vor. Einige Probanden zeigten eine Methylierungszunahme und andere eine Methylierungsabnahme[61].

In einer späteren und spezifischeren Analyse der gleichen Arbeitsgruppe wurden bei der Untersuchung von interindividuell verschieden methylierten Regionen über einen Zeitraum von 11 Jahren sowohl Regionen mit einem stabilen als auch mit einem dynamischen Methylierungsmuster entdeckt [59].

Eine longitudinale Studie, die ein dynamisches Methylierungsverhalten postuliert, ist von Wong et al. durchgeführt worden. Drei neuropsychiatrische Genloci zeigten keine Stabilität bei einer Untersuchung über einen Zeitraum von 5 Jahren [65].

Die Ergebnisse der epigenetischen Stabilität dieser Arbeit werden gestützt durch die Ergebnisse von Talens et al. Sie untersuchten acht Genloci mit großen interindividuellen Methylierungsunterschieden im Blut über einen Zeitraum von 11-20 Jahren sowie in Wangenschleimhaut über einen Zeitraum von 2-8 Jahren. Dabei entdeckten sie kaum einen Unterschied in der durchschnittlichen DNA-Methylierung beim Vergleich der beiden Zeitpunkte. Talens et al. überprüften die individuelle Stabilität ebenfalls durch die Korrelation der Methylierungsraten der beiden Zeitpunkte. Dort zeigten sich nur fünf von acht Loci stabil [79].

In einer Studie von Zhang et al. werden die Ergebnisse des zum Großteil stabilen Epigenoms weiter untermauert. Bei der Untersuchung von zehn monozygoten Zwillingspaaren zeigten sich keine größeren Unterschiede im Methylierungsmuster bei einer Analyse des Epigenoms 3, 6 oder 9 Monaten im Anschluss an eine Erstanalyse. Die wenigen detektierten dynamischen Positionen variierten stark im interindividuellen Vergleich und zeigten sich teilweise nur kurzzeitig als dynamisch [58].

**Tabelle 8: Überblick über longitudinale Studien zur Stabilität der DNA-Methylierung mit einem Beobachtungszeitraum im späteren Leben**

<b>Author</b>	<b>Jahr</b>	<b>Kohorte</b>	<b>Zeitraum</b>	<b>Ergebnis</b>
Bjornsson et al. [61]	2008	(111&126 Probanden)	11 & 16 Jahre	Variation der DNA-Methylierung >20% in 8-10% der Probanden ≤5% in 40-60% der Probanden
Feinberg et al. [59]	2010	74 Probanden	11 Jahre	Die Hälfte der untersuchten VMRs epigenetisch stabil
Wong et al. [65]	2010	46 monozygote & 45 dizygote Zwillingspaare	5 Jahre	3 Genloci: dynamisches Methylierungsverhalten
Talens et al. [79]	2010	34 Probanden (Blut & Wangenschleimhaut)	11-20J Blut, 2-8 J Wange	5 von 8 Loci in beiden Geweben stabil über die Zeit
Zhang et al. [58]	2015	10 monozygote Zwillingspaare + 8 Probanden	3,6,9 Monate	Kein signifikanter „epigenetischer Drift“ innerhalb der 9 Monate

Die longitudinalen Studien zur epigenetischen Stabilität mit Beginn zu einem variablen Zeitpunkt weit nach der Geburt zeigten ebenfalls eine hohe Stabilität epigenetischer Modifikationen. Sie untermauern damit die Ergebnisse dieser Arbeit der epigenetischen Stabilität des *GNASAS*- und *POMC*-Locus.

### **5.3.3. Vergleich zu Querschnittsstudien**

Die Ergebnisse dieser Dissertation lassen sich ebenfalls mit einigen Querschnittsstudien zur Stabilität der DNA-Methylierung vergleichen. Im Rahmen von Querschnittsstudien wurden monozygote Zwillinge verschiedenen Alters in ihrer DNA-Methylierung miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass sich jüngere Zwillingspaare epigenetisch ähnlicher waren als ältere Zwillingspaare [60, 62]. Beim Vergleich der DNA-Methylierung von Neugeborenen mit Hundertjährigen zeigte sich bei den Hundertjährigen eine sehr viel geringere DNA-Methylierung [88]. In einer großen Querschnittsstudie zur epigenetischen Stabilität im Kindesalter wurden Jungs im Alter von 3-17 Jahren untersucht. Es zeigte sich, dass 2078 von über 27.000 CpG-Positionen einen altersabhängigen Methylierungsunterschied aufwiesen, wobei die Methylierungsabnahme häufiger auftrat. Die in Kindern identifizierten altersabhängigen

CpG-Positionen überlappten zu einem großen Teil mit den in Querschnittsstudien in Erwachsenen identifizierten altersabhängigen CpG-Positionen. Es fiel aber auf, dass die Methylierungsänderung im Kindesalter drei bis viermal höher ist als im Erwachsenenalter [63].

Die Querschnittsstudien postulieren eher ein dynamisches Methylierungsverhalten als ein stabiles Epigenom. In Querschnittsstudien wird die DNA-Methylierung verschiedener Individuen unterschiedlichen Alters miteinander verglichen, wohingegen longitudinale Studien die DNA-Methylierung eines Probanden über eine bestimmte Zeitspanne untersuchen. Zhang et al. haben in zehn monozygoten Zwillingspaaren nach verschiedenen methylierten CpG-Positionen gesucht. Es wurden zwischen 327 und 5743 verschiedenen methylierte CpG-Positionen bei >375.000 untersuchten CpG-Positionen pro Zwillingsspaar identifiziert. Es zeigte sich keine CpG-Position in allen 10 Paaren verschieden methyliert [58]. Mit dieser Studie wurde gezeigt, dass die verschieden methylierten CpG-Positionen interindividuell sehr variabel sind. Dies könnte erklären, warum Querschnittsstudien eher ein dynamisches Methylierungsverhalten aufzeigen. Zusammenfassend ist zu sagen, dass das durch Querschnittsstudien postulierte dynamische Verhalten der DNA-Methylierung in longitudinalen Studien nur zu einem geringen Anteil bestätigt wurde.

Die stabile DNA-Methylierung im *POMC*- und *GNASAS*-Locus ist gut vereinbar mit der derzeitigen Studienlage. Vor allem die Geburtskohortenstudien zur epigenetischen Stabilität zeigen, dass die DNA-Methylierung nur zu einem sehr geringen Prozentsatz (<2%) ein altersabhängiges dynamisches Methylierungsverhalten aufzeigt. Auch longitudinale Studien im späteren Erwachsenenalter zur Stabilität des Epigenoms zeigen eine geringe Dynamik. In Querschnittsstudien zeigte sich vermehrt ein dynamisches Verhalten epigenetischer Modifikationen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die dynamischen CpG-Positionen interindividuell sehr variabel sind [58].

#### **5.4. Limitationen der Arbeit**

Insgesamt war es ein großer Erfolg, dass aus den zum Teil sehr alten Neugeborenen-Screeningkarten die DNA-Extraktionen überhaupt erfolgreich waren und eine DNA-Methylierungsuntersuchung mittels Pyrosequenzierung erfolgen konnte. Die Arbeit mit der Neugeborenen-Screeningkarte stellte insgesamt eine große Herausforderung dar. In einigen Fällen zeigte sich bei der Filterpapierkarte des

Neugeborenen Screenings, dass diese nicht ausreichend mit Blut durchtränkt worden war oder schon viel Material für andere Analysen verbraucht worden war.

Die Gewinnung von ausreichend DNA-Material aus dem Trockenblut der Neugeborenen Screeningkarte war methodisch sehr schwierig. Das vorhandene Material an Filterpapier pro Proband war sehr gering. Die Extraktion der DNA aus dem zum Teil lange gelagerten Trockenblut resultierte in einigen Fällen in einer für eine Bisulfit-PCR ungenügenden DNA-Menge. Außerdem scheint die Qualität der extrahierten DNA zum Teil minderwertig gewesen zu sein, da es bei vermeintlich erfolgreicher DNA-Extraktion und Messung einer ausreichend hohen DNA-Menge in der quantitativen Analyse der Fluorometrie trotzdem zu Misserfolgen im Rahmen der Bisulfit-PCR oder der Pyrosequenzierung kam. Eine Erklärung hierfür ist die Bisulfitumwandlung, die als relativ aggressives Verfahren die DNA schädigen kann. Dass die DNA-Menge, die aus den Neugeborenen Screeningkarten extrahiert worden war, häufig sehr gering war, zeigte sich auch an dem detektierten Lichtsignal in der Pyrosequenzierung. Dieses zeigte sich bei der aus Trockenblut extrahierten DNA niedriger im Vergleich zu dem Lichtsignal, das bei der Pyrosequenzierung der DNA extrahiert aus EDTA-Blut detektiert wurde. Aufgrund der geringen Materialmenge konnte für jeden Probanden meistens nur eine Analyse durchgeführt werden. Es war nur in wenigen Ausnahmefällen genügend Material vorhanden, um einen Probanden erneut zu untersuchen, falls die erste Pyrosequenzierung ein fragliches Ergebnis lieferte oder die PCR in der Gelelektrophorese keine Bande zeigte. Es war deshalb leider nicht möglich die DNA-Methylierung eines Probanden zum Zeitpunkt des Neugeborenen Screenings mehrmals zu untersuchen, um durch Mittelung der Ergebnisse technische Schwankungen auszugleichen.

Aufgrund der technisch anspruchsvollen Methodik und dem geringen Material aus dem Neugeborenen Screening konnte bei weniger Probanden ein auswertbares Ergebnis erzielt werden, als es ursprünglich bei der Rekrutierung von 96 Probanden geplant war. Der Beobachtungszeitraum von Geburt bis zur EDTA-Blutentnahme weist eine breite Streuung von wenigen Monaten bis zu 24 Jahren auf. In prospektiven Studien [64, 66, 86, 87] ist der Beobachtungszeitraum für alle Probanden gleich lang. Dieser variable Beobachtungszeitraum ist ebenfalls als Limitation anzusehen.



## 5.5. Vorteile der Arbeit

Die Dissertation beschreibt die weltweit erste Untersuchung der DNA-Methylierung von Geburt bis zu einem maximalen Lebensalter von 24 Jahren. Es ist bis zum heutigen Zeitpunkt keine Studie bekannt, die in der Länge des Untersuchungszeitraum vergleichbar ist. Es wurde in dieser Dissertation für den *POMC*-Locus ein durchschnittlicher Beobachtungszeitraum von 11,3 Jahren sowie für den *GNASAS*-Locus ein durchschnittlicher Beobachtungszeitraum von 9,9 Jahren nach der Geburt untersucht. Es wurde im Rahmen dieser Dissertation gezeigt, dass die DNA-Methylierung in einer DNA-Probe gewonnen aus dem Trockenblut einer Neugeborenen-Screeningkarte mittels Pyrosequenzierung untersucht werden kann. Trotz der sehr geringen DNA-Menge konnte die Pyrosequenzierung durchgeführt werden. Durch Vorversuche wurde die Vergleichbarkeit der DNA-Methylierung im Trockenblut der Neugeborenen-Screeningkarte mit der DNA-Methylierung im EDTA-Blut bestätigt. Es wurde die Methodik durch die Untersuchung der DNA-Methylierung an einem als stabil geltenden imprinteten Locus, dem *GNASAS*-Locus, validiert.

Die Analyse der DNA-Methylierung an den beiden Loci erfolgte mittels Pyrosequenzierung. Die Pyrosequenzierung ist zum heutigen Zeitpunkt der Goldstandard für die Analyse der DNA-Methylierung. Im Rahmen der Pyrosequenzierung wird die Methylierung eines Cytosins innerhalb der CpG-Position prozentgenau bestimmt. In anderen Studien zur longitudinalen Untersuchung der DNA-Methylierung wurde das Methylierungsverhalten mit dem HumanMethylation BeadChip untersucht [66, 80]. Mit dem HumanMethylation BeadChip wird zwar eine sehr große Anzahl an CpG-Positionen untersucht, die aber zufällig ausgewählt werden. Im Nachhinein erfolgt eine Zuordnung der identifizierten CpG-Positionen zu assoziierten Genen. Im Vergleich dazu konnte im Rahmen dieser Studie mit Hilfe der Pyrosequenzierung gezielt ein Locus sowie ein Kontrolllocus untersucht werden.

Die Probandenzahl scheint mit 35 (*GNASAS*) bzw. mit 55 (*POMC*) Probanden relativ gering und limitiert die Untersuchung der Assoziation der DNA-Methylierung mit dem BMI-SDS. Doch vergleicht man die Probandenzahl mit den bisher publizierten longitudinalen Studien, die das Methylierungsverhalten ab der Geburt untersucht haben, führten diese ihre Untersuchung an 30 Probanden [64] [86] , 15 Probanden [87] oder 10 Probanden durch [66]. Im Vergleich zu den bisher durchgeführten Studien zeigt sich daher eher eine hohe Probandenzahl.

Ein weiterer Vorteil dieser Studie ist die Homogenität der untersuchten Kohorte. Es handelt sich um Kinder oder Jugendliche, die in Berlin geboren sind und zum Zeitpunkt der zweiten Untersuchung immer noch in Berlin leben.

Beim Vergleich dieser longitudinalen Untersuchung mit den Ergebnissen aus Epigenom-weiten Assoziationsstudien (EWAS) zeigte sich ein weiterer Vorteil dieser Arbeit. In EWAS wurde nach einer Assoziation zwischen dem BMI und der DNA-Methylierung gesucht [81, 82]. Dabei ist es schwierig zwischen Ursache und Wirkung zu unterscheiden. Es ist nicht klar, ob die unterschiedlich methylierten CpG-Positionen zum Übergewicht geführt haben oder das Übergewicht die unterschiedlich methylierten CpG-Positionen hervorgerufen hat. Die longitudinale Untersuchung mit Analysebeginn vor der Entstehung von Übergewicht, die in dieser Dissertation angewendet wurde, ist besser zur Unterscheidung zwischen Ursache und Wirkung geeignet.

## **5.6. Schlussfolgerung und Ausblick**

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die DNA-Methylierung des *POMC* Intron2/Exon3-Locus auf ihre Stabilität untersucht. Der *POMC* Intron2/Exon3-Übergang hatte in einer vorangegangenen Studie eine Assoziation zwischen der DNA-Methylierung und dem BMI gezeigt. In dieser Arbeit konnte nun dargestellt werden, dass die DNA-Methylierung an diesem Locus von Geburt bis ins spätere Kindesalter und zum Teil frühe Erwachsenenalter stabil ist. Dazu konnte zunächst gezeigt werden, dass die U2-Neugeborenencreeningkarte zur DNA-Methylierungsanalyse bei Geburt verwendet werden kann. Es konnte in dieser Untersuchung aufgrund der Kohortengröße der erwartete Zusammenhang zwischen der DNA-Methylierung bei Geburt und dem Körpergewicht im späteren Leben nicht hergestellt werden. Eine Untersuchung einer größeren Kohorte könnte diesen Zusammenhang eventuell nachreichen.

Die epigenetische Stabilität am *POMC* Intron2/Exon3-Locus ist essentiell für die Identifikation dieses Locus als potentiell humanes metastabiles Epiallel.

Mit der in dieser Dissertation etablierten Methodik eröffnen sich neue wissenschaftliche Möglichkeiten. Die Analyse der DNA-Methylierung in Trockenblut einer Neugeborenencreeningkarte ist valide möglich. In Deutschland wird im Rahmen der U2-Vorsorgeuntersuchung seit den 1980er Jahren das Neugeborenencreening durchgeführt. Dabei wird für die eigentliche Untersuchung, die Testung auf verschiedene angeborene Stoffwechselerkrankungen, meist nur ein Teil des

vorhandenen mit Blut getränkten Filterpapiers verbraucht. Das zusätzliche Material wird meist eingelagert. Mithilfe der in dieser Dissertation angewandten Methodik und dem Material der unzähligen U2-Untersuchungen könnten noch viele weitere longitudinale Untersuchungen der DNA-Methylierung unternommen werden.

Die longitudinale Untersuchung der DNA-Methylierung anhand von Neugeborenencreeningkarten bietet zudem einen weiteren Vorteil. Der Einfluss epigenetischer Variationen auf die Entwicklung von Krankheiten im späteren Leben wird in der aktuellen Forschung stark fokussiert. Dabei ist es nicht leicht zu unterscheiden, ob eine Krankheit aufgrund einer epigenetischen Variante entsteht oder die epigenetische Variation aufgrund der Erkrankung entsteht. Die Analyse der DNA aus dem Trockenblut der Neugeborenencreeningkarte könnte dabei eine entscheidende Hilfe sein. Sie bietet die Möglichkeit der Untersuchung der DNA-Methylierung bei Geburt, wo viele der aktuell fokussierten Erkrankungen noch nicht bestehen. Es könnte somit zwischen Ursache und Wirkung unterschieden werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. WHO. *Media centre: Fact sheet: Obesity and overweight*. updated June 2016 [cited 2016 August]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
2. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, Amann M, Anderson HR, Andrews KG, Aryee M, Atkinson C, Bacchus LJ, Bahalim AN, Balakrishnan K, Balmes J, Barker-Collo S, Baxter A, Bell ML, Blore JD, Blyth F, Bonner C, Borges G, Bourne R, Boussinesq M, Brauer M, Brooks P, Bruce NG, Brunekreef B, Bryan-Hancock C, Bucello C, Buchbinder R, Bull F, Burnett RT, Byers TE, Calabria B, Carapetis J, Carnahan E, Chafe Z, Charlson F, Chen H, Chen JS, Cheng AT-A, Child JC, Cohen A, Colson KE, Cowie BC, Darby S, Darling S, Davis A, Degenhardt L, Dentener F, Des Jarlais DC, Devries K, Dherani M, Ding EL, Dorsey ER, Driscoll T, Edmond K, Ali SE, Engell RE, Erwin PJ, Fahimi S, Falder G, Farzadfar F, Ferrari A, Finucane MM, Flaxman S, Fowkes FGR, Freedman G, Freeman MK, Gakidou E, Ghosh S, Giovannucci E, Gmel G, Graham K, Grainger R, Grant B, Gunnell D, Gutierrez HR, Hall W, Hoek HW, Hogan A, Hosgood HD, Hoy D, Hu H, Hubbell BJ, Hutchings SJ, Ibeanusi SE, Jacklyn GL, Jasrasaria R, Jonas JB, Kan H, Kanis JA, Kassebaum N, Kawakami N, Khang Y-H, Khatibzadeh S, Khoo J-P, Kok C, Laden F, Lalloo R, Lan Q, Lathlean T, Leasher JL, Leigh J, Li Y, Lin JK, Lipshultz SE, London S, Lozano R, Lu Y, Mak J, Malekzadeh R, Mallinger L, Marcenes W, March L, Marks R, Martin R, McGale P, McGrath J, Mehta S, Mensah GA, Merriman TR, Micha R, Michaud C, Mishra V, Hanafiah KM, Mokdad AA, Morawska L, Mozaffarian D, Murphy T, Naghavi M, Neal B, Nelson PK, Nolla JM, Norman R, Olives C, Omer SB, Orchard J, Osborne R, Ostro B, Page A, Pandey KD, Parry CDH, Passmore E, Patra J, Pearce N, Pelizzari PM, Petzold M, Phillips MR, Pope D, Pope III CA, Powles J, Rao M, Razavi H, Rehfuss EA, Rehm JT, Ritz B, Rivara FP, Roberts T, Robinson C, Rodriguez-Portales JA, Romieu I, Room R, Rosenfeld LC, Roy A, Rushton L, Salomon JA, Sampson U, Sanchez-Riera L, Sanman E, Sapkota A, Seedat S, Shi P, Shield K, Shivakoti R, Singh GM, Sleet DA, Smith E, Smith KR, Stapelberg NJC, Steenland K, Stöckl H, Stovner LJ, Straif K, Straney L, Thurston GD, Tran JH, Van Dingenen R, van Donkelaar A, Veerman JL, Vijayakumar L, Weintraub R, Weissman MM, White RA, Whiteford H, Wiersma ST, Wilkinson JD, Williams HC, Williams W, Wilson N, Woolf AD, Yip P, Zielinski JM, Lopez AD, Murray CJL and Ezzati M, *A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. *Lancet*, 2012. **380**(9859): p. 2224-60.
3. The GBDOC, Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, Mullany EC, Biryukov S, Abbafati C, Abera SF, Abraham JP, Abu-Rmeileh NME, Achoki T, AlBuhairan FS, Alemu ZA, Alfonso R, Ali MK, Ali R, Guzman NA, Ammar W, Anwari P, Banerjee A, Barquera S, Basu S, Bennett DA, Bhutta Z, Blore J, Cabral N, Nonato IC, Chang J-C, Chowdhury R, Courville KJ, Criqui MH, Cundiff DK, Dabhadkar KC, Dandona L, Davis A, Dayama A, Dharmaratne SD, Ding EL, Durrani AM, Esteghamati A, Farzadfar F, Fay DFJ, Feigin VL, Flaxman A, Forouzanfar MH, Goto A, Green MA, Gupta R, Hafezi-Nejad N, Hankey GJ, Harewood HC, Havmoeller R, Hay S, Hernandez L, Husseini A, Idrisov BT, Ikeda N, Islami F, Jahangir E, Jassal SK, Jee SH, Jeffreys M, Jonas JB, Kabagambe EK, Khalifa SEAH, Kengne AP, Khader YS, Khang Y-H, Kim D, Kimokoti RW, Kinge JM, Kokubo Y, Kosen S, Kwan G, Lai T, Leinsalu M, Li Y, Liang X, Liu S, Logroscino G, Lotufo PA, Lu Y, Ma J, Mainoo NK, Mensah GA, Merriman

- TR, Mokdad AH, Moschandreas J, Naghavi M, Naheed A, Nand D, Narayan KMV, Nelson EL, Neuhouser ML, Nisar MI, Ohkubo T, Oti SO, Pedroza A, Prabhakaran D, Roy N, Sampson U, Seo H, Sepanlou SG, Shibuya K, Shiri R, Shiue I, Singh GM, Singh JA, Skirbekk V, Stapelberg NJC, Sturua L, Sykes BL, Tobias M, Tran BX, Trasande L, Toyoshima H, van de Vijver S, Vasankari TJ, Veerman JL, Velasquez-Melendez G, Vlassov VV, Vollset SE, Vos T, Wang C, Wang SX, Weiderpass E, Werdecker A, Wright JL, Yang YC, Yatsuya H, Yoon J, Yoon S-J, Zhao Y, Zhou M, Zhu S, Lopez AD, Murray CJL and Gakidou E, *Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980-2013: A systematic analysis*. Lancet (London, England), 2014. **384**(9945): p. 766-81.
4. Hekkala A, Ilonen J, Knip M, and Veijola R, *Family history of diabetes and distribution of class II HLA genotypes in children with newly diagnosed type 1 diabetes: effect on diabetic ketoacidosis*. Eur J Endocrinol, 2011. **165**: p. 813 - 7.
  5. Maunakea A, Nagarajan R, Bilenky M, Ballinger T, D'Souza C, and Fouse S, *Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters*. Nature, 2010. **466**: p. 253 - 7.
  6. Effertz T, Engel S, Verheyen F, and Linder R, *The costs and consequences of obesity in Germany: a new approach from a prevalence and life-cycle perspective*. The European Journal of Health Economics, 2015: p. 1-18.
  7. Mensink GBM, Schienkiewitz A, Haftenberger M, Lampert T, Ziese T, and Scheidt-Nave C, *Übergewicht und Adipositas in Deutschland*. Bundesgesundheitsbl, 2013. **56**(5-6): p. 786-94.
  8. Kurth BM and Schaffrath Rosario A, *Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland*. Bundesgesundheitsbl, 2010. **53**(7): p. 643-52.
  9. Kromeyer-Hauschild K, Wabitsch M, Kunze D, Geller F, Geiß HC, Hesse V, von Hippel A, Jaeger U, Johnsen D, Korte W, Menner K, Müller G, Müller JM, Niemann-Pilatus A, Remer T, Schaefer F, Wittchen HU, Zabransky S, Zellner K, Ziegler A, and Hebebrand J, *Perzentile für den Body-mass-Index für das Kindes- und Jugendalter unter Heranziehung verschiedener deutscher Stichproben*. Monatsschr Kinderheilkd, 2001. **149**(8): p. 807-18.
  10. Khosla T and Billewicz WZ, *Measurement of change in body-weight*. British Journal of Nutrition, 2007. **18**(1): p. 227-39.
  11. Johnson D and Drenick EJ, *Therapeutic fasting in morbid obesity: Long-term follow-up*. Archives of Internal Medicine, 1977. **137**(10): p. 1381-2.
  12. Mitchel JS and Keesey RE, *Defense of a lowered weight maintenance level by lateral hypothalamically lesioned rats: Evidence from a restriction-refeeding regimen*. Physiology & Behavior, 1977. **18**(6): p. 1121-5.
  13. Harris RBS, Kasser TR, and Martin RJ, *Dynamics of Recovery of Body Composition After Overfeeding, Food Restriction or Starvation of Mature Female Rats*. The Journal of Nutrition, 1986. **116**(12): p. 2536-46.
  14. Forbes GB, Brown MR, Welle SL, and Lipinski BA, *Deliberate overfeeding in women and men: energy cost and composition of the weight gain*. British Journal of Nutrition, 2007. **56**(1): p. 1-9.
  15. Stunkard AJ, Sørensen TIA, Hanis C, Teasdale TW, Chakraborty R, Schull WJ, and Schulsinger F, *An Adoption Study of Human Obesity*. New England Journal of Medicine, 1986. **314**(4): p. 193-8.
  16. Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, and McClearn GE, *The Body-Mass Index of Twins Who Have Been Reared Apart*. New England Journal of Medicine, 1990. **322**(21): p. 1483-7.

17. Bouchard C, Tremblay A, Després J-P, Nadeau A, Lupien PJ, Thériault G, Dussault J, Moorjani S, Pinault S, and Fournier G, *The Response to Long-Term Overfeeding in Identical Twins*. *New England Journal of Medicine*, 1990. **322**(21): p. 1477-82.
18. Elks CE, den Hoed M, Zhao JH, Sharp SJ, Wareham NJ, Loos RJF, and Ong KK, *Variability in the Heritability of Body Mass Index: A Systematic Review and Meta-Regression*. *Frontiers in Endocrinology*, 2012. **3**: p. 29.
19. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, and Friedman JM, *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. *Nature*, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
20. Mayer J, Russell RE, Bates MW, and Dickie MM, *Metabolic, nutritional and endocrine studies of the hereditary obesity-diabetes syndrome of mice and mechanism of its development*. *Metabolism: clinical and experimental*, 1953. **2**(1): p. 9-21.
21. Zheng D, Jones JP, Usala SJ, and Dohm GL, *Differential Expression of ob mRNA in Rat Adipose Tissues in Response to Insulin*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996. **218**(2): p. 434-7.
22. Takahashi H, Hakamata Y, Watanabe Y, Kikuno R, Miyata T, and Numa S, *Complete nucleotide sequence of the human corticotropin-beta-lipotropin precursor gene*. *Nucleic Acids Research*, 1983. **11**(19): p. 6847-58.
23. Coll AP, Farooqi IS, Challis BG, Yeo GSH, and O'Rahilly S, *Proopiomelanocortin and Energy Balance: Insights from Human and Murine Genetics*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2004. **89**(6): p. 2557-62.
24. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, and Tepper RI, *Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R*. *Cell*, 1995. **83**(7): p. 1263-71.
25. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, and Low MJ, *Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus*. *Nature*, 2001. **411**(6836): p. 480-4.
26. Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hrubby VJ, and Cone RD, *Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome*. *Nature*, 1997. **385**(6612): p. 165-8.
27. Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, and Lee F, *Targeted Disruption of the Melanocortin-4 Receptor Results in Obesity in Mice*. *Cell*, 1997. **88**(1): p. 131-41.
28. Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkison WO, and Cone RD, *Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor*. *Nature*, 1994. **371**(6500): p. 799-802.
29. Zarjevski N, Cusin I, Vettor R, Rohner-Jeanrenaud F, and Jeanrenaud B, *Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity*. *Endocrinology*, 1993. **133**(4): p. 1753-8.
30. Tao Y-X, *The Melanocortin-4 Receptor: Physiology, Pharmacology, and Pathophysiology*. *Endocrine Reviews*, 2010. **31**(4): p. 506-43.
31. Govaerts C, Srinivasan S, Shapiro A, Zhang S, Picard F, Clement K, Lubrano-Berthelier C, and Vaisse C, *Obesity-associated mutations in the melanocortin 4 receptor provide novel insights into its function*. *Peptides*, 2005. **26**(10): p. 1909-19.
32. Mencarelli M, Dubern B, Alili R, Maestrini S, Benajiba L, Tagliaferri M, Galan P, Rinaldi M, Simon C, Tounian P, Hercberg S, Liuzzi A, Di Blasio AM, and Clement K,

- Rare melanocortin-3 receptor mutations with in vitro functional consequences are associated with human obesity.* Human Molecular Genetics, 2011. **20**(2): p. 392-9.
33. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, and Gruters A, *Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans.* Nat Genet, 1998. **19**(2): p. 155-7.
  34. Farooqi IS, Drop S, Clements A, Keogh JM, Biernacka J, Lowenbein S, Challis BG, and O'Rahilly S, *Heterozygosity for a POMC-Null Mutation and Increased Obesity Risk in Humans.* Diabetes, 2006. **55**(9): p. 2549-53.
  35. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, Allen HL, Lindgren CM, Luan Ja, Magi R, Randall JC, Vedantam S, Winkler TW, Qi L, Workalemahu T, Heid IM, Steinthorsdottir V, Stringham HM, Weedon MN, Wheeler E, Wood AR, Ferreira T, Weyant RJ, Segre AV, Estrada K, Liang L, Nemesh J, Park J-H, Gustafsson S, Kilpelainen TO, Yang J, Bouatia-Naji N, Esko T, Feitosa MF, Kutalik Z, Mangino M, Raychaudhuri S, Scherag A, Smith AV, Welch R, Zhao JH, Aben KK, Absher DM, Amin N, Dixon AL, Fisher E, Glazer NL, Goddard ME, Heard-Costa NL, Hoesel V, Hottenga J-J, Johansson A, Johnson T, Ketkar S, Lamina C, Li S, Moffatt MF, Myers RH, Narisu N, Perry JRB, Peters MJ, Preuss M, Ripatti S, Rivadeneira F, Sandholt C, Scott LJ, Timpson NJ, Tyrer JP, van Wingerden S, Watanabe RM, White CC, Wiklund F, Barlassina C, Chasman DI, Cooper MN, Jansson J-O, Lawrence RW, Pellikka N, Prokopenko I, Shi J, Thiering E, Alavere H, Alibrandi MTS, Almgren P, Arnold AM, Aspelund T, Atwood LD, Balkau B, Balmforth AJ, Bennett AJ, Ben-Shlomo Y, Bergman RN, Bergmann S, Biebermann H, Blakemore AIF, Boes T, Bonnycastle LL, Bornstein SR, Brown MJ, Buchanan TA, Busonero F, Campbell H, Cappuccio FP, Cavalcanti-Proenca C, Chen Y-DI, Chen C-M, Chines PS, Clarke R, Coin L, Connell J, Day INM, Heijer Md, Duan J, Ebrahim S, Elliott P, Elosua R, Eiriksdottir G, Erdos MR, Eriksson JG, Facheris MF, Felix SB, Fischer-Posovszky P, Folsom AR, Friedrich N, Freimer NB, Fu M, Gaget S, Gejman PV, Geus EJC, Gieger C, Gjesing AP, Goel A, Goyette P, Grallert H, Graszler J, Greenawalt DM, Groves CJ, Gudnason V, Guiducci C, Hartikainen A-L, Hassanali N, Hall AS, Havulinna AS, Hayward C, Heath AC, Hengstenberg C, Hicks AA, Hinney A, Hofman A, Homuth G, Hui J, Igl W, Iribarren C, Isomaa B, Jacobs KB, Jarick I, Jewell E, John U, Jorgensen T, Jousilahti P, Jula A, Kaakinen M, Kajantie E, Kaplan LM, Kathiresan S, Kettunen J, Kinnunen L, Knowles JW, Kolcic I, Konig IR, Koskinen S, Kovacs P, Kuusisto J, Kraft P, Kvaloy K, Laitinen J, Lantieri O, Lanzani C, Launer LJ, Lecocour C, Lehtimaki T, Lettre G, Liu J, Lokki M-L, Lorentzon M, Luben RN, Ludwig B, Manunta P, Marek D, Marre M, Martin NG, McArdle WL, McCarthy A, McKnight B, Meitinger T, Melander O, Meyre D, Midthjell K, Montgomery GW, Morken MA, Morris AP, Mulic R, Ngwa JS, Nelis M, Neville MJ, Nyholt DR, O'Donnell CJ, O'Rahilly S, Ong KK, Oostra B, Pare G, Parker AN, Perola M, Pichler I, Pietilainen KH, Platou CGP, Polasek O, Pouta A, Rafelt S, Raitakari O, Rayner NW, Ridderstrale M, Rief W, Ruukonen A, Robertson NR, Rzehak P, Salomaa V, Sanders AR, Sandhu MS, Sanna S, Saramies J, Savolainen MJ, Scherag S, Schipf S, Schreiber S, Schunkert H, Silander K, Sinisalo J, Siscovick DS, Smit JH, Soranzo N, Sovio U, Stephens J, Surakka I, Swift AJ, Tammesoo M-L, Tardif J-C, Teder-Laving M, Teslovich TM, Thompson JR, Thomson B, Tonjes A, Tuomi T, van Meurs JBJ, van Ommen G-J, Vatin V, Viikari J, Visvikis-Siest S, Vitart V, Vogel CIG, Voight BF, Waite LL, Wallaschofski H, Walters GB, Widen E, Wiegand S, Wild SH, Willemsen G, Witte DR, Wittman JC, Xu J, Zhang Q, Zgaga L, Ziegler A, Zitting P, Beilby JP, Farooqi IS, Hebebrand J, Huikuri HV, James AL, Kahonen M, Levinson DF, Macciardi F, Nieminen MS, Ohlsson C, Palmer LJ, Ridker PM, Stumvoll M, Beckmann JS, Boeing H,

- Boerwinkle E, Boomsma DI, Caulfield MJ, Chanock SJ, Collins FS, Cupples LA, Smith GD, Erdmann J, Froguel P, Gronberg H, Gyllensten U, Hall P, Hansen T, Harris TB, Hattersley AT, Hayes RB, Heinrich J, Hu FB, Hveem K, Illig T, Jarvelin M-R, Kaprio J, Karpe F, Khaw K-T, Kiemenev LA, Krude H, Laakso M, Lawlor DA, Metspalu A, Munroe PB, Ouwehand WH, Pedersen O, Penninx BW, Peters A, Pramstaller PP, Quertermous T, Reinehr T, Rissanen A, Rudan I, Samani NJ, Schwarz PEH, Shuldiner AR, Spector TD, Tuomilehto J, Uda M, Uitterlinden A, Valle TT, Wabitsch M, Waeber G, Wareham NJ, Watkins H, Wilson JF, Wright AF, Zillikens MC, Chatterjee N, McCarroll SA, Purcell S, Schadt EE, Visscher PM, Assimes TL, Borecki IB, Deloukas P, Fox CS, Groop LC, Haritunians T, Hunter DJ, Kaplan RC, Mohlke KL, O'Connell JR, Peltonen L, Schlessinger D, Strachan DP, van Duijn CM, Wichmann HE, Frayling TM, Thorsteinsdottir U, Abecasis GR, Barroso I, Boehnke M, Stefansson K, North KE, I McCarthy M, Hirschhorn JN, Ingelsson E and Loos RJF, *Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index*. Nat Genet, 2010. **42**(11): p. 937-48.
36. Heid IM, Jackson AU, Randall JC, Winkler TW, Qi L, Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Zillikens MC, Speliotes EK, Magi R, Workalemahu T, White CC, Bouatia-Naji N, Harris TB, Berndt SI, Ingelsson E, Willer CJ, Weedon MN, Luan J, Vedantam S, Esko T, Kilpelainen TO, Kutalik Z, Li S, Monda KL, Dixon AL, Holmes CC, Kaplan LM, Liang L, Min JL, Moffatt MF, Molony C, Nicholson G, Schadt EE, Zondervan KT, Feitosa MF, Ferreira T, Allen HL, Weyant RJ, Wheeler E, Wood AR, Estrada K, Goddard ME, Lettre G, Mangino M, Nyholt DR, Purcell S, Smith AV, Visscher PM, Yang J, McCarroll SA, Nemesh J, Voight BF, Absher D, Amin N, Aspelund T, Coin L, Glazer NL, Hayward C, Heard-Costa NL, Hottenga J-J, Johansson A, Johnson T, Kaakinen M, Kapur K, Ketkar S, Knowles JW, Kraft P, Kraja AT, Lamina C, Leitzmann MF, McKnight B, Morris AP, Ong KK, Perry JRB, Peters MJ, Polasek O, Prokopenko I, Rayner NW, Ripatti S, Rivadeneira F, Robertson NR, Sanna S, Sovio U, Surakka I, Teumer A, van Wingerden S, Vitart V, Zhao JH, Cavalcanti-Proenca C, Chines PS, Fisher E, Kulzer JR, Lecocour C, Narisu N, Sandholt C, Scott LJ, Silander K, Stark K, Tammesoo M-L, Teslovich TM, Timpson NJ, Watanabe RM, Welch R, Chasman DI, Cooper MN, Jansson J-O, Kettunen J, Lawrence RW, Pellikka N, Perola M, Vandenput L, Alavere H, Almgren P, Atwood LD, Bennett AJ, Biffar R, Bonnycastle LL, Bornstein SR, Buchanan TA, Campbell H, Day INM, Dei M, Dorr M, Elliott P, Erdos MR, Eriksson JG, Freimer NB, Fu M, Gaget S, Geus EJC, Gjesing AP, Grallert H, Graszler J, Groves CJ, Guiducci C, Hartikainen A-L, Hassanali N, Havulinna AS, Herzig K-H, Hicks AA, Hui J, Igl W, Jousilahti P, Jula A, Kajantie E, Kinnunen L, Kolcic I, Koskinen S, Kovacs P, Kroemer HK, Krzely V, Kuusisto J, Kvaloy K, Laitinen J, Lantieri O, Lathrop GM, Lokki M-L, Luben RN, Ludwig B, McArdle WL, McCarthy A, Morken MA, Nelis M, Neville MJ, Pare G, Parker AN, Peden JF, Pichler I, Pietilainen KH, Platou CGP, Pouta A, Ridderstrale M, Samani NJ, Saramies J, Sinisalo J, Smit JH, Strawbridge RJ, Stringham HM, Swift AJ, Teder-Laving M, Thomson B, Usala G, van Meurs JBJ, van Ommen G-J, Vatin V, Volpato CB, Wallaschofski H, Walters GB, Widen E, Wild SH, Willemsen G, Witte DR, Zgaga L, Zitting P, Beilby JP, James AL, Kahonen M, Lehtimäki T, Nieminen MS, Ohlsson C, Palmer LJ, Raitakari O, Ridker PM, Stumvoll M, Tonjes A, Viikari J, Balkau B, Ben-Shlomo Y, Bergman RN, Boeing H, Smith GD, Ebrahim S, Froguel P, Hansen T, Hengstenberg C, Hveem K, Isomaa B, Jorgensen T, Karpe F, Khaw K-T, Laakso M, Lawlor DA, Marre M, Meitinger T, Metspalu A, Midthjell K, Pedersen O, Salomaa V, Schwarz PEH, Tuomi T, Tuomilehto J, Valle TT, Wareham NJ, Arnold AM, Beckmann JS, Bergmann S, Boerwinkle E, Boomsma DI, Caulfield MJ, Collins FS, Eiriksdottir G,



- Gudnason V, Gyllensten U, Hamsten A, Hattersley AT, Hofman A, Hu FB, Illig T, Iribarren C, Jarvelin M-R, Kao WHL, Kaprio J, Launer LJ, Munroe PB, Oostra B, Penninx BW, Pramstaller PP, Psaty BM, Quertermous T, Rissanen A, Rudan I, Shuldiner AR, Soranzo N, Spector TD, Syvanen A-C, Uda M, Uitterlinden A, Volzke H, Vollenweider P, Wilson JF, Witteman JC, Wright AF, Abecasis GR, Boehnke M, Borecki IB, Deloukas P, Frayling TM, Groop LC, Haritunians T, Hunter DJ, Kaplan RC, North KE, O'Connell JR, Peltonen L, Schlessinger D, Strachan DP, Hirschhorn JN, Assimes TL, Wichmann HE, Thorsteinsdottir U, van Duijn CM, Stefansson K, Cupples LA, Loos RJJ, Barroso I, McCarthy MI, Fox CS, Mohlke KL and Lindgren CM, *Meta-analysis identifies 13 new loci associated with waist-hip ratio and reveals sexual dimorphism in the genetic basis of fat distribution*. Nat Genet, 2010. **42**(11): p. 949-60.
37. Naukkarinen J, Surakka I, Pietiläinen KH, Rissanen A, Salomaa V, Ripatti S, Yki-Järvinen H, van Duijn CM, Wichmann HE, Kaprio J, Taskinen M-R, Peltonen L, and Consortium E, *Use of Genome-Wide Expression Data to Mine the "Gray Zone" of GWA Studies Leads to Novel Candidate Obesity Genes*. PLoS Genetics, 2010. **6**(6): p. e1000976.
  38. Llewellyn CH, Trzaskowski M, Plomin R, and Wardle J, *Finding the missing heritability in pediatric obesity: the contribution of genome-wide complex trait analysis*. Int J Obes, 2013. **37**(11): p. 1506-9.
  39. Yang J, Bakshi A, Zhu Z, Hemani G, Vinkhuyzen AAE, Lee SH, Robinson MR, Perry JRB, Nolte IM, van Vliet-Ostaptchouk JV, Snieper H, The LifeLines Cohort S, Esko T, Milani L, Magi R, Metspalu A, Hamsten A, Magnusson PKE, Pedersen NL, Ingelsson E, Soranzo N, Keller MC, Wray NR, Goddard ME, and Visscher PM, *Genetic variance estimation with imputed variants finds negligible missing heritability for human height and body mass index*. Nat Genet, 2015. **advance online publication**.
  40. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorf LA, Hunter DJ, McCarthy MI, Ramos EM, Cardon LR, Chakravarti A, Cho JH, Guttmacher AE, Kong A, Kruglyak L, Mardis E, Rotimi CN, Slatkin M, Valle D, Whittemore AS, Boehnke M, Clark AG, Eichler EE, Gibson G, Haines JL, Mackay TFC, McCarroll SA, and Visscher PM, *Finding the missing heritability of complex diseases*. Nature, 2009. **461**(7265): p. 747-53.
  41. Bjornsson HT, Daniele Fallin M, and Feinberg AP, *An integrated epigenetic and genetic approach to common human disease*. Trends in Genetics, 2004. **20**(8): p. 350-8.
  42. Singal R and Ginder GD, *DNA Methylation*. Blood, 1999. **93**(12): p. 4059-70.
  43. Feng Q and Zhang Y, *The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes*. Genes & Development, 2001. **15**(7): p. 827-32.
  44. Keshet I, Lieman-Hurwitz J, and Cedar H, *DNA methylation affects the formation of active chromatin*. Cell, 1986. **44**(4): p. 535-43.
  45. Bird AP, *DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA*. Nucleic Acids Research, 1980. **8**(7): p. 1499-504.
  46. Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, and Macleod D, *A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA*. Cell, 1985. **40**(1): p. 91-9.
  47. Saxonov S, Berg P, and Brutlag DL, *A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(5): p. 1412-7.

48. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, and Haaf T, *Embryogenesis: Demethylation of the zygotic paternal genome*. *Nature*, 2000. **403**(6769): p. 501-2.
49. Okano M, Bell DW, Haber DA, and Li E, *DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development*. *Cell*, 1999. **99**(3): p. 247-57.
50. Lyko F, Ramsahoye BH, Kashevsky H, Tudor M, Mastrangelo M-A, Orr-Weaver TL, and Jaenisch R, *Mammalian (cytosine-5) methyltransferases cause genomic DNA methylation and lethality in Drosophila*. *Nat Genet*, 1999. **23**(3): p. 363-6.
51. Li E, Bestor TH, and Jaenisch R, *Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality*. *Cell*, 1992. **69**(6): p. 915-26.
52. Smallwood SA and Kelsey G, *De novo DNA methylation: a germ cell perspective*. *Trends in Genetics*, 2012. **28**(1): p. 33-42.
53. Li E, Beard C, and Jaenisch R, *Role for DNA methylation in genomic imprinting*. *Nature*, 1993. **366**(6453): p. 362-5.
54. Monk D, *Germline-derived DNA methylation and early embryo epigenetic reprogramming: The selected survival of imprints*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2015. **67**: p. 128-38.
55. Gravina S, Dollé MET, Wang T, van Steeg H, Hasty P, Hoeijmakers J, and Vijg J, *High Preservation of CpG Cytosine Methylation Patterns at Imprinted Gene Loci in Liver and Brain of Aged Mice*. *PLoS ONE*, 2013. **8**(9): p. e73496.
56. Weksberg R, Ren Shen D, Ling Fei Y, Li Song Q, and Squire J, *Disruption of insulin-like growth factor 2 imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome*. *Nat Genet*, 1993. **5**(2): p. 143-50.
57. Angulo MA, Butler MG, and Cataletto ME, *Prader-Willi syndrome: a review of clinical, genetic, and endocrine findings*. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2015. **38**: p. 1249-63.
58. Zhang N, Zhao S, Zhang S-H, Chen J, Lu D, Shen M, and Li C, *Intra-Monozygotic Twin Pair Discordance and Longitudinal Variation of Whole-Genome Scale DNA Methylation in Adults*. *PLoS ONE*, 2015. **10**(8): p. e0135022.
59. Feinberg AP, Irizarry RA, Fradin D, Aryee MJ, Murakami P, Aspelund T, Eiriksdottir G, Harris TB, Launer L, Gudnason V, and Fallin MD, *Personalized Epigenomic Signatures That Are Stable Over Time and Covary with Body Mass Index*. *Science Translational Medicine*, 2010. **2**(49): p. 49ra67.
60. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suñer D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu Y-Z, Plass C, and Esteller M, *Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. **102**(30): p. 10604-9.
61. Bjornsson HT, Sigurdsson MI, Fallin MD, Irizarry RA, Aspelund T, Cui H, Yu W, Rongione MA, Ekström TJ, Harris TB, Launer LJ, Eiriksdottir G, Leppert MF, Sapienza C, Gudnason V, and Feinberg AP, *Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering*. *JAMA*, 2008. **299**(24): p. 2877-83.
62. Talens R, Christensen K, Putter H, Willemsen G, Christiansen L, and Kremer D, *Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs*. *Aging Cell*, 2012. **11**: p. 694 - 703.
63. Alisch RS, Barwick BG, Chopra P, Myrick LK, Satten GA, Conneely KN, and Warren ST, *Age-associated DNA methylation in pediatric populations*. *Genome Research*, 2012. **22**(4): p. 623-32.

64. Martino D, Loke Y, Gordon L, Ollikainen M, Cruickshank M, and Saffery R, *Longitudinal, genome-scale analysis of DNA methylation in twins from birth to 18 months of age reveals rapid epigenetic change in early life and pair-specific effects of discordance*. *Genome Biol*, 2013. **14**: p. R42.
65. Wong CCY, Caspi A, Williams B, Craig IW, Houts R, Ambler A, Moffitt TE, and Mill J, *A longitudinal study of epigenetic variation in twins*. *Epigenetics*, 2010. **5**(6): p. 516-26.
66. Acevedo N, Reinius L, Vitezic M, Fortino V, Soderhall C, Honkanen H, Veijola R, Simell O, Toppari J, Ilonen J, Knip M, Scheynius A, Hyoty H, Greco D, and Kere J, *Age-associated DNA methylation changes in immune genes, histone modifiers and chromatin remodeling factors within 5 years after birth in human blood leukocytes*. *Clinical Epigenetics*, 2015. **7**(1): p. 34.
67. Rakyan VK, Blewitt ME, Druker R, Preis JI, and Whitelaw E, *Metastable epialleles in mammals*. *Trends in Genetics*, 2002. **18**(7): p. 348-51.
68. Whitelaw E and Martin DIK, *Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals*. *Nat Genet*, 2001. **27**(4): p. 361-5.
69. Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, and Cooney CA, *Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice*. *The FASEB Journal*, 1998. **12**(11): p. 949-57.
70. Wolff GL, Roberts DW, and Galbraith DB, *Prenatal determination of obesity, tumor susceptibility, and coat color pattern in viable yellow (Avy/a) mice: The yellow mouse syndrome*. *Journal of Heredity*, 1986. **77**(3): p. 151-8.
71. Duhl DMJ, Vrieling H, Miller KA, Wolff GL, and Barsh GS, *Neomorphic agouti mutations in obese yellow mice*. *Nat Genet*, 1994. **8**(1): p. 59-65.
72. Wolff GL, *INFLUENCE OF MATERNAL PHENOTYPE ON METABOLIC DIFFERENTIATION OF AGOUTI LOCUS MUTANTS IN THE MOUSE*. *Genetics*, 1978. **88**(3): p. 529-39.
73. Morgan HD, Sutherland HGE, Martin DIK, and Whitelaw E, *Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse*. *Nat Genet*, 1999. **23**(3): p. 314-8.
74. Waterland RA and Jirtle RL, *Transposable Elements: Targets for Early Nutritional Effects on Epigenetic Gene Regulation*. *Molecular and Cellular Biology*, 2003. **23**(15): p. 5293-300.
75. Waterland RA, Travisano M, and Tahiliani KG, *Diet-induced hypermethylation at agouti viable yellow is not inherited transgenerationally through the female*. *The FASEB Journal*, 2007. **21**(12): p. 3380-5.
76. Waterland RA, Kellermayer R, Laritsky E, Rayco-Solon P, Harris RA, Travisano M, Zhang W, Torskaya MS, Zhang J, Shen L, Manary MJ, and Prentice AM, *Season of Conception in Rural Gambia Affects DNA Methylation at Putative Human Metastable Epialleles*. *PLoS Genet*, 2010. **6**(12): p. e1001252.
77. Dominguez-Salas P, Moore SE, Baker MS, Bergen AW, Cox SE, Dyer RA, Fulford AJ, Guan Y, Laritsky E, Silver MJ, Swan GE, Zeisel SH, Innis SM, Waterland RA, Prentice AM, and Hennig BJ, *Maternal nutrition at conception modulates DNA methylation of human metastable epialleles*. *Nat Commun*, 2014. **5**.
78. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, Slagboom PE, and Lumey LH, *Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008. **105**(44): p. 17046-9.
79. Talens RP, Boomsma DI, Tobi EW, Kremer D, Jukema JW, Willemsen G, Putter H, Slagboom PE, and Heijmans BT, *Variation, patterns, and temporal stability of DNA*

- methylation: considerations for epigenetic epidemiology*. The FASEB Journal, 2010. **24**(9): p. 3135-44.
80. Wang D, Liu X, Zhou Y, Xie H, Hong X, and Tsai H, *Individual variation and longitudinal pattern of genome-wide DNA methylation from birth to the first two years of life*. Epigenetics, 2012. **7**: p. 594 - 605.
  81. Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, Sandling JK, Aïssi D, Wahl S, Meduri E, Morange P-E, Gagnon F, Grallert H, Waldenberger M, Peters A, Erdmann J, Hengstenberg C, Cambien F, Goodall AH, Ouwehand WH, Schunkert H, Thompson JR, Spector TD, Gieger C, Trégouët D-A, Deloukas P, and Samani NJ, *DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis*. The Lancet. **383**(9933): p. 1990-8.
  82. Aslibekyan S, Demerath EW, Mendelson M, Zhi D, Guan W, Liang L, Sha J, Pankow JS, Liu C, Irvin MR, Fornage M, Hidalgo B, Lin L-A, Stanton Thibeault K, Bressler J, Tsai MY, Grove ML, Hopkins PN, Boerwinkle E, Borecki IB, Ordovas JM, Levy D, Tiwari HK, Absher DM, and Arnett DK, *Epigenome-wide study identifies novel methylation loci associated with body mass index and waist circumference*. Obesity, 2015. **23**(7): p. 1493-501.
  83. Kuehnen P, Mischke M, Wiegand S, Sers C, Horsthemke B, Lau S, Keil T, Lee Y-A, Grueters A, and Krude H, *An Alu Element-Associated Hypermethylation Variant of the <italic>POMC</italic> Gene Is Associated with Childhood Obesity*. PLoS Genet, 2012. **8**(3): p. e1002543.
  84. Qiagen. *Pyrosequencing Technology and Platform Overview*. Pyrosequencing — the unique detection and quantification technology 2017 [cited 2017 28.08.2017]; Available from: <https://www.qiagen.com/de/resources/technologies/pyrosequencing-resource-center/technology-overview/-principle>.
  85. Kühnen P, Handke D, Waterland Robert A, Hennig Branwen J, Silver M, Fulford Anthony J, Dominguez-Salas P, Moore Sophie E, Prentice Andrew M, Spranger J, Hinney A, Hebebrand J, Heppner Frank L, Walzer L, Grötzinger C, Gromoll J, Wiegand S, Grütters A, and Krude H, *Interindividual Variation in DNA Methylation at a Putative POMC Metastable Epiallele Is Associated with Obesity*. Cell Metabolism, 2016. **24**(3): p. 502-9.
  86. Murphy SK, Huang Z, and Hoyo C, *Differentially Methylated Regions of Imprinted Genes in Prenatal, Perinatal and Postnatal Human Tissues*. PLoS ONE, 2012. **7**(7): p. e40924.
  87. Urdinguio RG, Torró MI, Bayón GF, Álvarez-Pitti J, Fernández AF, Redon P, Fraga MF, and Lurbe E, *Longitudinal study of DNA methylation during the first 5 years of life*. Journal of Translational Medicine, 2016. **14**: p. 160.
  88. Heyn H, Li N, Ferreira HJ, Moran S, Pisano DG, Gomez A, Diez J, Sanchez-Mut JV, Setien F, Carmona FJ, Puca AA, Sayols S, Pujana MA, Serra-Musach J, Iglesias-Platas I, Formiga F, Fernandez AF, Fraga MF, Heath SC, Valencia A, Gut IG, Wang J, and Esteller M, *Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(26): p. 10522-7.

## 7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lena Walzer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung der Stabilität der DNA-Methylierung des *POMC*-Gens mittels Pyrosequenzierung von DNA aus Neugeborenenenscreeningkarten und EDTA-Blutproben“ 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](http://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.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, 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

### Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Lena Walzer hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Kühen P, Handke D, Waterland Robert A, Hennig Branwen J, Silver M, Fulford Anthony J, Dominguez-Salas P, Moore Sophie E, Prentice Andrew M, Spranger J, Hinney A, Hebebrand J, Heppner Frank L, **Walzer L**, Grötzinger C, Gromoll J, Wiegand S, Grüters A, and Krude H, *Interindividual Variation in DNA Methylation at a Putative POMC Metastable Epiallele Is Associated with Obesity*. Cell Metabolism, 2016. 24(3): p. 502-9.

Beitrag im Einzelnen: Der Beitrag von Lena Walzer an der Publikation bestand in der Analyse der Stabilität der DNA-Methylierung am *POMC*-Intron2/Exon3-Übergang vom

Zeitpunkt des Neugeborenen Screenings bis ins spätere Kindes-, Jugend- oder frühe Erwachsenenalter. Die dazu nötigen Laborarbeiten wurden eigenständig durchgeführt. Die Stabilitätsanalyse erfolgte mittels Korrelationsanalyse. Diese wurde in Abbildung 2C des Papers dargestellt.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

## **8. Tabellarischer Lebenslauf**

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

## 9. Publikationsliste

1. Kühnen P, Handke D, Waterland Robert A, Hennig Branwen J, Silver M, Fulford Anthony J, Dominguez-Salas P, Moore Sophie E, Prentice Andrew M, Spranger J, Hinney A, Hebebrand J, Heppner Frank L, **Walzer L**, Grötzinger C, Gromoll J, Wiegand S, Grüters A, and Krude H, *Interindividual Variation in DNA Methylation at a Putative POMC Metastable Epiallele Is Associated with Obesity*. Cell Metabolism, 2016. **24**(3): p. 502-9.



## 10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Heiko Krude möchte ich für die Überlassung des sehr interessanten Themas, für die freundliche Aufnahme in diese angenehme Arbeitsgruppe und vor allem für die unzähligen richtungsweisenden Korrektur- und Verbesserungsvorschläge danken.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Peter Kühnen für die intensive Betreuung während der gesamten Arbeitsphase. Von der Konzeption über die Durchführung bis zur Auswertung der vorliegenden Arbeit stand er mir mit seinem fachkundigen Rat, seinen wegweisenden Ideen und konstruktiven Korrektur- und Verbesserungsvorschlägen wirklich jederzeit beiseite.

Großer Dank geht auch an Frau Dr. Daniela Handke, die mich sehr geduldig in die labortechnischen Methoden einarbeitete. Ihre Unterstützung und kreativen Ideen bei der Fehleranalyse waren für das Gelingen dieser Arbeit von großer Bedeutung. Der gesamten Arbeitsgruppe der „Experimentellen pädiatrischen Endokrinologie“ danke ich für die herzliche Aufnahme in das Team und die angenehme Zusammenarbeit.

Ein ganz besonders großer Dank geht an meine lieben Eltern und meinen lieben Bruder für die unermüdliche emotionale Unterstützung, die unzähligen aufbauenden Worte sowie die Ermutigung zum Selbstvertrauen.

Zuletzt möchte ich all meinen lieben Freunden danken für den Zuspruch, die Geduld und die spaßbringende Ablenkung in den richtigen Momenten.