

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

DISSERTATION

**Analyse der CpG-Methylierung des *PAX8*-Gens bei  
Patienten mit Schilddrüsendysgenese**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von

Nele Haufs

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr.med. H. Krude  
2. Prof. Dr. K. Sperling  
3. Prof. Dr. rer. nat. B. Horsthemke

Datum der Promotion: 14.06.2009

Für meine Mutter

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die konnatale Hypothyreose (CH).....	1
1.2	Pathogenetische Konzepte der Schilddrüsendysgenese.....	7
1.3	Epigenetik .....	8
2	Herleiten einer Aufgabenstellung .....	15
3	Material und Methoden.....	18
3.1	Material .....	18
3.2	Auswahl der Proben .....	21
3.3	Genomische Analysen .....	22
3.4	DNA-Isolation .....	23
3.5	Natriumbisulfitbehandlung genomischer DNA.....	24
3.6	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	29
3.7	Gelelektrophorese.....	33
3.8	Klonierung des PCR-Produktes .....	33
3.9	Sequenzierung .....	35
4	Ergebnisse .....	37
4.1	CpG-Inseln im Bereich des <i>PAX8/Pax8</i> bei Mensch und Maus .....	37
4.2	Auswertung der Sequenzen.....	39
4.3	DNA- Methylierungsmuster humaner LZ-DNA und im Gewebevergleich .....	40
4.4	Ergebnisse der DNA- Methylierung bei der Maus .....	51
4.5	Ergebnisse der Methylierungsanalyse bei Patienten mit Schilddrüsenfehlbildungen .....	54
4.6	Ergebnisse der Methylierungsanalyse bei Zwillingen mit diskordanter konnataler Hypothyreose .....	63
5	Diskussion.....	71
5.1	Bedeutung der Position der identifizierten humanen CpG-Islands .....	72
5.2	Diskussion der Methylierung im <i>PAX8</i> -Gen .....	73
5.3	Diskussion der Ergebnisse bei Patienten mit Schilddrüsenfehlbildungen sowie bei diskordanten Zwillingen mit CH.....	77
5.4	Entwicklung weiterer Hypothesen für die Pathogenese der CH:.....	83
6	Zusammenfassung.....	86
7	Literaturverzeichnis .....	88
8	Verzeichnis der Abbildungen.....	98
9	Verzeichnis der Tabellen .....	100
10	Abkürzungen.....	101
	Lebenslauf.....	102
	Danksagung .....	103
	Publikationen und Abstracts .....	104
	Erklärung .....	105

# 1 Einleitung

## 1.1 Die konnatale Hypothyreose (CH)

### 1.1.1 Klassifikation und Epidemiologie

Die **primäre konnatale Hypothyreose** ist der häufigste angeborene Defekt des endokrinen Systems. Diese ist gekennzeichnet durch erniedrigte oder fehlende Spiegel der Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) sowie eines erhöhten Spiegels an Thyreotropin (TSH) im Serum. Die primäre konnatale Hypothyreose tritt weltweit mit einer Inzidenz von 1 zu 3-4000 Neugeborenen auf. Ausnahmen bilden die afro-amerikanische Bevölkerungsgruppe in den USA mit 1 zu 10000 sowie eine Bevölkerungsgruppe mittelamerikanischen Ursprungs (Hispanics) mit 1 zu 2000 erkrankten Neugeborenen (Roberts et al. 1997) (Lorey et al. 1992). Mädchen sind zwei bis viermal häufiger betroffen als Jungen (Lorey et al. 1992) (Devos et al. 1999). Das Auftreten der Erkrankung zeigt keine jahreszeitlichen Schwankungen (Deladoey et al. 2007)(Abb. 1).

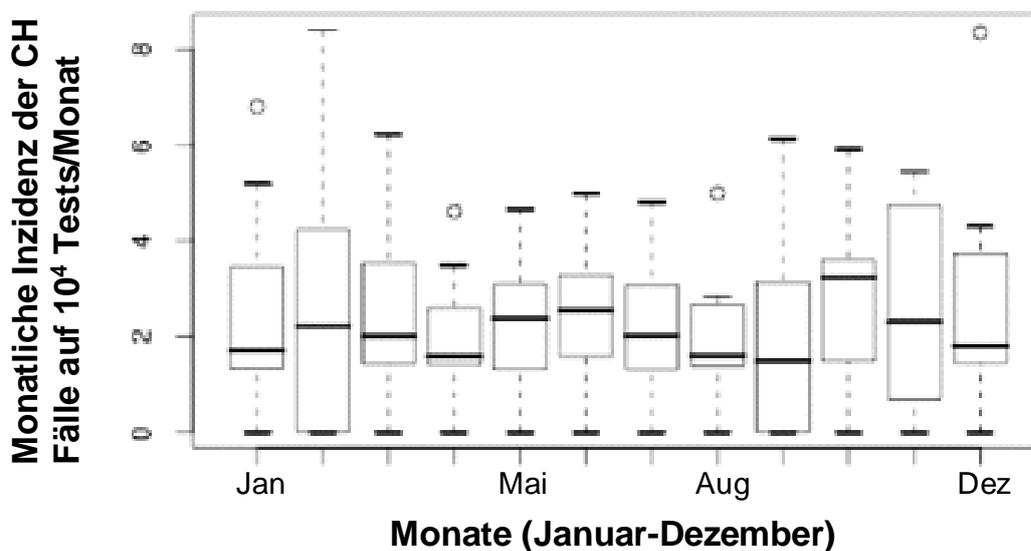


Abb. 1 Monatliche Inzidenz von CH über 16 Jahre  
(nach Deladoey et al. 2007)

Sehr viel seltener mit einer Häufigkeit von 1:50000 (Grüters et al. 2003) wird eine **zentrale sekundäre Hypothyreose** diagnostiziert, bei der eine Störung auf hypophysärer oder hypothalamischer Ebene besteht. Dadurch kommt es zu einer Beeinträchtigung der TSH- oder TRH- (Thyreotropin-Releasing-Hormon) Produktion.

### **1.1.2 Klinik**

Klinische Zeichen sind bei der Geburt nur gering ausgeprägt und unspezifisch. Diese sind unter anderem Trinkfaulheit, Bewegungsarmut, Icterus prolongatus und Makroglossie. Wichtigste Funktionen der Schilddrüsenhormone sind im Kindesalter die Ausdifferenzierung des Nervensystems sowie der Einfluss auf das Wachstum. Vor Einführen des Neugeborenen Screenings war die konnatale Hypothyreose daher eine der häufigsten Ursachen für mentale Retardierung und Wachstumsverzögerung. Das Neugeborenen Screening wurde in Europa Ende der siebziger Jahre eingeführt und erfolgt durch eine Bestimmung des TSH-Wertes zwischen dem dritten und fünften Lebenstag. Die Therapie besteht in lebenslanger Substitution von Schilddrüsenhormonen in Form von L-Thyroxin. In circa 90 % der Fälle kann bei adäquater rechtzeitiger Substitution von Schilddrüsenhormonen eine gute Langzeitprognose erreicht werden, bei bis zu 10 % der Patienten ist die neuropsychologische Entwicklung trotz optimaler Therapie weiterhin unbefriedigend (Grüters et al. 2002).

Das Auftreten assoziierter Malformationen schwankt in der Literatur zwischen 2,4 (Chanoine et al. 1986) und 20-25facher (Fernhoff et al. 1987) (Siebner et al. 1992) Erhöhung gegenüber der Normalbevölkerung, am häufigsten wird dabei eine Kombination von Schilddrüsendysgenese und angeborenem Herzfehler beobachtet (Devos et al. 1999).

### **1.1.3 Ätiologie**

Aus ätiologischer Sicht werden bei der primären konnatalen Hypothyreose die Biosynthesedefekte von den Schilddrüsendysgenesen unterschieden.

#### **1.1.3.1 Biosynthesedefekte**

Biosynthesedefekte findet man in 15-20% der Fälle als Ursache für eine konnatale Hypothyreose (Grüters et al. 2004). Biosynthesedefekte können unterschiedliche Stufen der Schilddrüsenhormonsynthese betreffen.

##### **1.1.3.1.1 Bildung und Sekretion der Schilddrüsenhormone**

Wesentlicher Bestandteil der Schilddrüsenhormone ist Jod, das in Form von Jodid aus dem Blutkreislauf in die Thyreozyten aufgenommen und dabei zu elementarem Jod oxidiert wird (Jodination). Anschließend erfolgt der Einbau des elementaren Jods an die Tyrosingruppe des Matrixproteins Thyreoglobulin (Jodisation). Durch Kopplung zweier

jodierter Tyrosinreste entsteht T<sub>4</sub>, das zusammen mit T<sub>3</sub> im Thyreoglobulin (TG) gespeichert wird. Nur ein geringer Teil des biologisch aktiven T<sub>3</sub> wird intrathyroidal gebildet, der größte Teil entsteht peripher durch Abspaltung eines Jodmoleküls aus T<sub>4</sub>. Beide Schilddrüsenhormone werden in den Schilddrüsen-Follikeln gespeichert und bei Bedarf in die Peripherie abgegeben.

### 1.1.3.1.2 Morphologie und Kandidatengene der Biosynthesedefekte

Morphologisch zeigt sich bei den Biosynthesedefekten eine normale oder vergrößerte Schilddrüse (SD) an orthotoper Lage (Tabelle 1). Für diese Gruppe konnten Mutationen in verschiedenen Kandidatengenen, die an der Synthese des T<sub>4</sub> beteiligt sind, als pathogenetischer Faktor verantwortlich gemacht werden. Diese sind z.B. die Thyreoperoxidase (*TPO*) (Ambrugger et al. 2001; Bikker et al. 1995), der Natrium-Iodid-Symporter (*NIS*) (Levy et al. 1998) sowie das Thyreoglobulin-Gen (*Tg*) (Ieiri et al. 1991; van de Graaf et al. 1999).

	Darstellung SD im US	Darstellung SD in der Szintigraphie	Serum TSH	Serum T <sub>4</sub>	Serum TG
<b><u>SD-Dysgenese</u></b>					
<b>Athyreose</b>	Kein SD-Gewebe	Keine Aufnahme	erhöht	Nicht nachweisbar- stark erniedrigt	Nicht nachweis- bar-stark erniedrigt
<b>Ektopie</b>	Kein SD-Gewebe	Ektopische Aufnahme	erhöht	Niedrig-unterer Normbereich	Niedrig- normal
<b>Hypoplasie</b>	Hypoplastischer SD-Rest	Keine Aufnahme	erhöht	Nicht nachweisbar- unterer Normbereich	Nicht nachweis- bar-normal
<b><u>Biosynthese- defekte</u></b>	Normal- vergrößerte SD	Keine Aufnahme/ normale Aufnahme; normales oder vergrößertes Volumen	erhöht	Nicht nachweisbar- unterer Normbereich	Nicht nachweis- bar-erhöht
<b><u>Zentrale Hypothyreose</u></b>	Hypoplastische SD	Verminderte Aufnahme; vermindertes Volumen	Nicht nach- weisbar- erniedrigt	Nicht nachweisbar- unterer Normbereich	Nicht nachweis- bar-normal

**Tabelle 1 Diagnose der CH**

Nach Grüters et al. 2004.

Für die richtige Eingruppierung der CH ist eine Kombination von bildgebenden Verfahren wie Ultraschall (US) und Szintigraphie sowie einer Bestimmung von TSH, T<sub>4</sub> und TG im Serum notwendig.

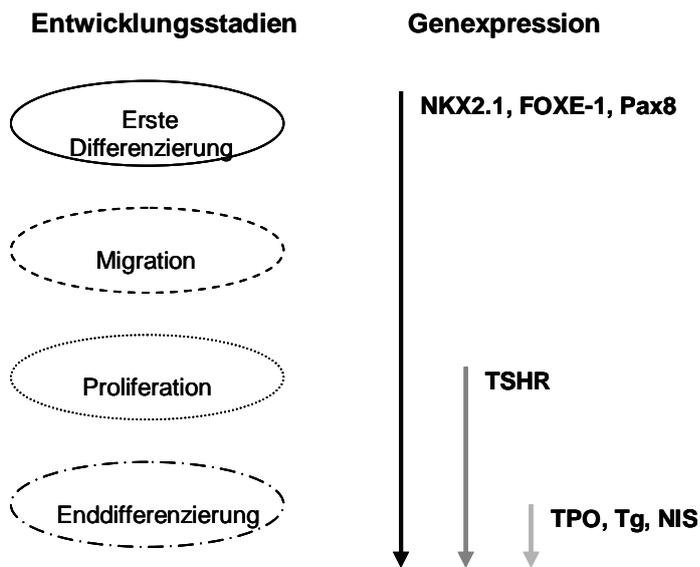
### **1.1.3.2 Schilddrüsendysgenesien**

Die Schilddrüsendysgenesien stellen mit 75-85% die weitaus größere Gruppe der permanenten konnatalen Hypothyreosen dar (Grüters et al. 2004). Sie werden nach der Morphologie in Athyreose, Ektopie, Hypoplasie sowie Hemithyroidea unterteilt (Tab.1). Die Dysgenesien treten vorwiegend sporadisch auf. In nur 2% der Fälle lässt sich eine familiäre Häufung nachweisen (Castanet et al. 2002). Die Ursache ist bisher größtenteils ungeklärt, die morphologischen Befunde sprechen jedoch für einen Entwicklungsdefekt.

#### **1.1.3.2.1 Normale Entwicklung der Schilddrüse**

Die Schilddrüse entwickelt sich bei Säugetier und Mensch aus zwei verschiedenen embryonalen Ursprüngen: Die Schilddrüsenhormon-produzierenden Follikelzellen haben einen endodermalen Ursprung, aus dem sich das Schilddrüsendivertikel bildet. Die parafollikulären Calcitonin-produzierenden C-Zellen stammen aus den Ultimobranchialkörpern und haben ihren Ursprung in der Neuralleiste (neuroektodermaler Ursprung). Nach abgeschlossener Migration und Fusion der beiden Zellpopulationen findet eine weitere Differenzierung der Follikelzellen statt, die auch durch die Expression der für die Schilddrüsenhormonproduktion wichtigen Faktoren wie dem *TSH*-Rezeptor, des Natrium-Iodid-Symporters (*NIS*), der *TPO* sowie des *Tg*-Gens gekennzeichnet ist (Abb. 2).

Die SD-Dysgenese betrifft nicht die C-Zellen, wie normale Calcitonin-Spiegel dieser Patienten anzeigen. Daher steht im Weiteren die Entwicklung und Regulation der Follikel-bildenden endodermalen Schilddrüsenanlage im Vordergrund.



**Abb. 2 Schematische Darstellung der Entwicklung von Schilddrüsenfollikelzellen und chronologische Darstellung der Genexpression**  
(modifiziert nach Djemli et al. 2006)

### 1.1.3.2.2 Kandidatengene der Schilddrüsendysgenese

Über Knock-Out-Mausmodelle konnten vier verschiedene Transkriptionsfaktoren als Kandidatengene für die Schilddrüsendysgenese identifiziert werden: *Pax8*, *Foxe-1* (auch *Ttf-2*, *Fkhl15*), *Nkx2.1* (auch *Ttf-1*, *Titf-1*, *T / Ebp*) und *Hex1*. Diese Transkriptionsfaktoren sind für eine normale Entwicklung der Schilddrüse sowie für eine normale Expression von *TPO*, *TG* und *TSH*-Rezeptor entscheidend (Abb. 2) (Damante et al. 1994; Zannini et al. 1997).

Das ***Pax8*-Gen** gehört zur Familie der *Pax*-Gene, die durch eine Paired-Domäne charakterisiert ist. *Pax*-Gene spielen eine wichtige Rolle bei der Organogenese. Eine *Pax8*-Expression während der Schilddrüsenentwicklung wurde erstmals von Plachov et al. gezeigt (Plachov et al. 1990). Ebenso wird *Pax8* in der Niere und dem zentralen Nervensystem exprimiert. Homozygote *Pax8* <sup>-/-</sup> Mäuse kommen mit der erwarteten Häufigkeit zur Welt, zeigen sich jedoch deutlich kleiner als ihre Geschwister und versterben bald nach der Geburt (Mansouri et al. 1998). Bei der *Pax8* Knock-out-Maus findet sich eine ausgeprägte konnatale Hypothyreose. Anatomisch zeigt sich eine hypoplastische Schilddrüse an orthotoper Lage, die keine Follikelzellen enthält und überwiegend aus C-Zellen besteht. Die anderen *Pax8*-exprimierenden Organe ließen sich normal darstellen. Bei Patienten mit konnataler Hypothyreose konnten insgesamt 7 verschiedene heterozygote *PAX8*-Mutationen, darunter zwei Patienten mit einem sporadischen Auftreten sowie 5 familiäre Fälle mit einem autosomal dominanten

Erbgang, identifiziert werden (Macchia et al. 1998; Congdon et al. 2001; Grasberger et al. 2005; Meeus et al. 2004; Vilain et al. 2001). Bei den meisten dieser Patienten liegt die konnatale Hypothyreose isoliert vor, nur in wenigen Fällen ist diese assoziiert mit einer Hypo- oder Aplasie der Niere. Die Tatsache, dass im Unterschied zur Maus Menschen mit einer heterozygoten *PAX8*-Mutation einen Defekt der Schilddrüse aufweisen, deutet auf einen Gendosiseffekt hin. Dabei scheint die Schilddrüse das empfindlichste Organ gegenüber einer *PAX8*-Gendosisreduktion zu sein.

Das ***Foxe-1*** gehört zu der Familie, die durch eine „forkhead DNA binding domain“ charakterisiert sind. Die *Ttf-2* Knock-out-Maus zeigt eine Athyreose oder eine ektopische Schilddrüse kombiniert mit einer Lippenkiefergaumenspalte aufgrund derer sie postnatal versterben (De Felice et al. 1998). Ein Mutationsscreening in diesem Gen bei Patienten mit isolierter konnataler Hypothyreose erwies sich als unauffällig (Macchia et al. 1999). Jedoch konnte bei einem Geschwisterpaar mit Bamforth-Syndrom (Entwicklungsverzögerung, Konnatale Hypothyreose, Lippenkiefergaumenspalte, krauses Haar und Choanalatresie) eine homozygote Funktionsverlust-Mutation nachgewiesen werden (Clifton-Bligh et al. 1998). Einige wenige andere familiäre Fälle einer Funktionsverlust-Mutation mit Athyreose und Lippen-Kiefer-Gaumenspalte bei autosomal rezessivem Erbgang sind beschrieben worden (Castanet et al. 2002).

Das ***Nkx2.1*** gehört zur *Nkx2*-Familie, die durch eine Homöodomäne gekennzeichnet ist. *Nkx2.1* wird in der Schilddrüse, im Hypothalamus, in den Basalganglien, in der Hypophyse und in der Lunge exprimiert (Kimura et al. 1996). Die Mäuse versterben unmittelbar nach der Geburt aufgrund ihrer stark hypoplastischen und strukturell veränderten Lunge. Die neugeborene *Nkx2.1* Knock-out-Maus zeigt morphologisch eine Athyreose sowie eine Hypophysenagenesie. Eine Mutationsanalyse bei Patienten mit isolierter konnataler Hypothyreose zeigte keine Auffälligkeiten (Lapi et al. 1997). Bei einigen Patienten mit konnataler Hypothyreose, Lungenerkrankungen und Choreoathetose konnte eine heterozygote Mutation im *NKX2.1*-Gen nachgewiesen werden (Krude et al. 2002).

Bei der ***Hex1*** Knock-out-Maus zeigt sich neben schweren Veränderungen des ZNS und der Leber ein hypoplastisches oder aplastisches Schilddrüsenprimordium, das in späteren Entwicklungsstadien in einer Athyreose endet (Martinez Barbera et al. 2000). Mutationen beim Menschen sind bislang nicht beschrieben worden.

Insgesamt konnten Mutationen in den bisher bekannten Transkriptionsfaktoren in weniger als 5% der Fälle von kongenitaler Hypothyreose nachgewiesen werden (Grüters et al. 2004).

#### **1.1.4 Kongenitale Hypothyreose bei monozygoten Zwillingen**

Monozygote Zwillinge stammen von derselben Zygote und besitzen dadurch identische Kern-DNA. Bisher sind in der Literatur 13 monozygote Zwillingspaare mit kongenitaler Hypothyreose und Schilddrüsendysgenese beschrieben worden: Perry et al. 2002 fasst die Daten von zwei großen Screeningscentern in Quebec (Canada) und Brüssel zusammen und beschreibt 5 monozygote diskordante Zwillingspaare mit kongenitaler Hypothyreose und Schilddrüsendysgenese. Zuvor waren in der Literatur sieben weitere Fälle von diskordanten monozygoten Zwillingen sowie ein Fall von kongordanten monozygoten Zwillingen beschrieben worden (McLean et al. 1985). Dieses bisher einzige publizierte kongordante Zwillingepaar weist Unterschiede im Phänotyp auf: Der eine Zwilling zeigt eine permanente kongenitale Hypothyreose mit einer ektopisch gelegenen Schilddrüse kranial des Zungenbeines (Os hyoideum), der andere Zwilling hingegen eine transiente kongenitale Hypothyreose mit einer Hemiagenese der Schilddrüse.

**Zusammenfassend** tritt die Schilddrüsendysgenese demnach überwiegend sporadisch auf, monozygote Zwillinge erweisen sich in der Regel hinsichtlich ihrer Erkrankung als diskordant und nur bei ca. 5% der Patienten konnten bisher Mutationen in einem der Kandidatengene nachgewiesen werden. Daher ist die Entwicklung neuer pathogenetischer Konzepte notwendig, die diese Fakten berücksichtigen.

## **1.2 Pathogenetische Konzepte der Schilddrüsendysgenese**

### **1.2.1 Diskordanz von monozygoten Zwillingen bei anderen Erkrankungen**

Diskordanz von monozygoten Zwillingen ist auch bei anderen Krankheitsbildern beschrieben worden (Gringras et al. 2001; Singh et al. 2002).

Genetische Ursachen konnten zum Teil für die Diskordanz verantwortlich gemacht werden. Diese können zum einen auf Chromosomenebene als auch auf DNA-Ebene greifen. Ein Beispiel für verschiedene Karyotypen ist das Turner-Syndrom, bei dem neun diskordante monozygote Zwillinge beschrieben wurden (Gringras et al. 2001; Kurosawa et al. 1992). Hierbei handelt es sich um einen postzygotischen mitotischen

Fehler, der eine Heterokaryotypie zur Folge hat. Ein weiteres Beispiel für die Diskordanz monozygoter weiblicher Zwillinge zeigt sich in einer nicht zufälligen („skewed“) X-Inaktivierung bei X-chromosomal gebundenen genetischen Defekten. Beispiele hierfür sind unter anderem das fragile X-Syndrom (Kruyer et al. 1994), Farbenblindheit (Jorgensen et al. 1992), Muskeldystrophie Duchenne (Zneimer et al. 1993), Haemophilie B sowie Hunter- und Fabry-Krankheit (Tiberio 1994). In diesen Fällen weist der erkrankte Zwilling eine nicht zufällige X-Inaktivierung zugunsten des Wildtyp-Gens auf, so dass das Wildtyp-Gen inaktiviert wird. Als Summe aus der heterozygoten Mutation und der „skewed“ X-Inaktivierung resultiert das gleiche Krankheitsbild wie bei einem betroffenen Jungen, der eine Mutation auf dem X-Chromosom trägt. Die X-Inaktivierung wird durch eine DNA-Methylierung als postzygoter epigenetischer Mechanismus vermittelt (Goto et al. 1998). Wie diese Beispiele X-chromosomal-gekoppelter Krankheiten zeigen, kann die Diskordanz monozygoter Zwillinge durch postzygote somatische Mutationen oder durch epigenetische Mechanismen verursacht werden.

### **1.3 Epigenetik**

Russo et al. definierten 1996 die Epigenetik als Studium von mitotisch und / oder meiotisch vererbaren Veränderungen der Genfunktion, die nicht durch Veränderungen in der DNA-Sequenz erklärt werden können.

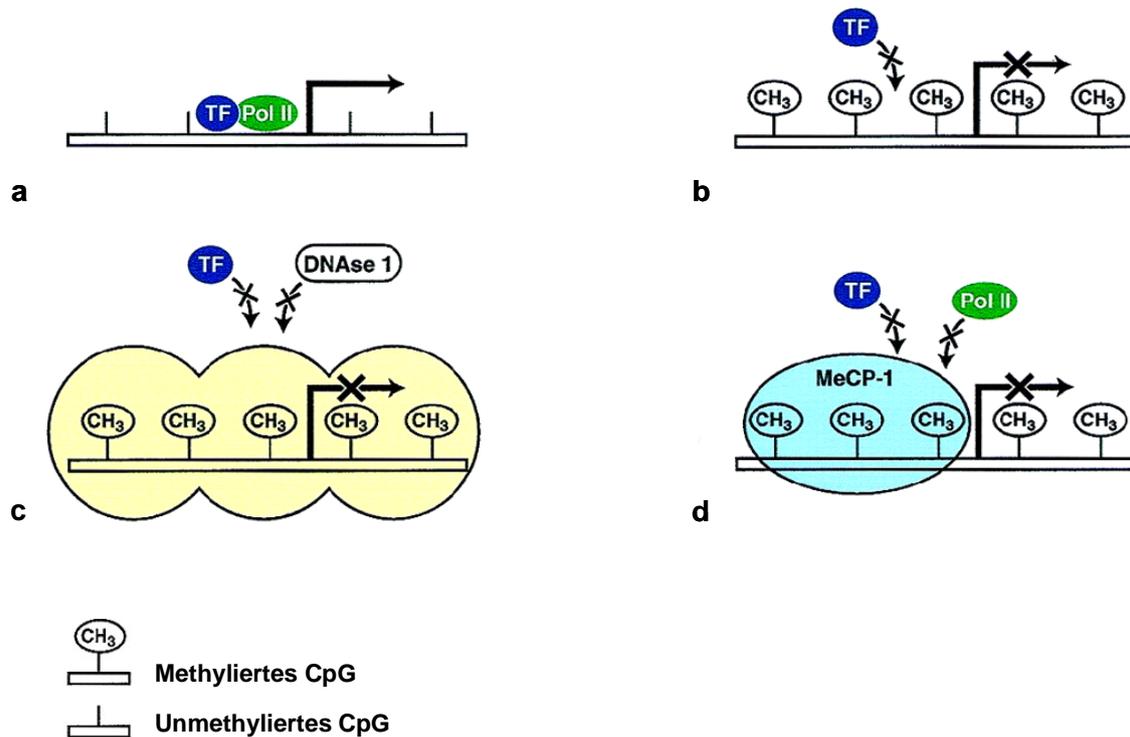
Epigenetische Modifikationen sind für verschiedene genetische Funktionen wie beispielsweise die oben genannte X-Inaktivierung, Chromosomenstabilität oder die Transkription von Bedeutung (Bird et al. 1999; Chen et al. 1998; Nakao 2001; Wolffe et al. 1999). Eine Hauptaufgabe der epigenetischen Kontrolle liegt in der Regulation der Genexpression. Dabei spielen Veränderungen der Histone (Acetylierung/ Methylierung) in Verbindung mit der Chromatinstruktur sowie DNA-Veränderungen im Sinne einer DNA-Methylierung eine entscheidende Rolle (Bird et al. 1999; Sleutels et al. 2002; Wolffe et al. 1999). Eine Histonacetylierung und DNA-Hypomethylierung ist dabei vorwiegend mit einer aktiven Genexpression assoziiert, während eine Histon-Deacetylierung und DNA-Methylierung einen inaktiven Expressionsgrad anzeigt.

#### **1.3.1 DNA-Methylierung bei Mensch und Säugetier**

Die DNA-Methylierung ist beim Menschen und Säugetier vorrangig am Cytosin beschrieben worden, dem unmittelbar in der DNA-Sequenz ein Guanin folgt (CpG-

Dinukleotid). Hierbei wird ein Kohlenstoffatom an Position 5 des Pyrimidinrings methyliert (Abb. 5, S.27). Das 5-Methylcytosin (5mC) wurde erstmals als 5. Base im Jahre 1948 beschrieben (Hotchkiss et al.). Im Genom finden sich zwei typische Verteilungsmuster: Zum einen liegen CpG-Dinukleotide verstreut vor, die in 70-80% der Fälle methyliert sind (Ehrlich et al. 1982), zum anderen findet man sie als CpG-Inseln organisiert, die häufig nicht methyliert vorliegen und in regulationsrelevanten Bereichen von Genen zu finden sind.

In der Definition einer CpG-Insel von 1987 wurde in einem Sequenzbereich von mindestens 200 Basenpaaren ein Cytosin- und Guanin-Gehalt von über 50% mit einer CpG-Dinukleotidrate von über 60% festgelegt (Gardiner-Garden et al. 1987). Systematische Computeranalysen des menschlichen Genoms weisen 29000 CpG-Inseln nach (Lander et al. 2001; Venter et al. 2001). Frühere Studien gehen davon aus, dass 60% der menschlichen Gene mit CpG-Inseln assoziiert sind (Antequera et al. 1993). Die CpG-Inseln finden sich gehäuft in Promotorregionen, dessen Methylierungsgrad ein entscheidendes molekulares Signal für den aktiven oder inaktiven Zustand eines Gens sein kann. Diese CpG-Inseln liegen überwiegend unmethyliert vor und ermöglichen ein normales Ablesen des Gens (Transkription) (Bird 2002). Die DNA-Methylierung einer Promotorregion kann die Transkription auf unterschiedliche Weise verhindern (Abb. 3).



### Abb. 3 Beispiele von DNA-Methylierung und Transkriptionsverlust

(modifiziert nach Singal et al. 1999: a) normale Bindung eines Transkriptionsfaktors (TF) und der RNA-Polymerase Typ II (Pol II) an unmethylierte DNA-Sequenz b) direkte Bindung des TF durch 5mC nicht möglich b) durch 5mC unzugängliche Chromatinstruktur für TF c) Bindung von Methylcytosinbindenden Proteinen (MeCP) an 5mC verhindert Bindung von TF

### 1.3.2 Ausbilden des Methylierungsmusters bei Mensch und Säugetier

Die meisten CpG-Inseln liegen unmethyliert vor, dennoch wird in einigen Fällen eine CpG-Insel während der Entwicklung hypermethyliert und ist dann für die Inaktivierung des assoziierten Gens von Bedeutung. Dieser Mechanismus der Hypermethylierung spielt z.B. im Imprinting, der X-Inaktivierung sowie in der Tumorentstehung in Form einer somatischen Inaktivierung von Proto-Onkogenen eine Rolle. Neuere Arbeiten weisen auf die Möglichkeit gewebespezifischer Methylierung und damit einer gewebespezifischen Regulation der Gen-Expression durch DNA-Methylierung hin (Song et al. 2005; Yamada et al. 2004).

Methylierungsmuster sind das Ergebnis von Demethylierung, de novo-Methylierung, und Erhalten der Methylierung (Jeltsch 2002). Diese epigenetische Reprogrammierung hat einen unmittelbaren Einfluß auf die Chromatinstruktur (Reik et al. 2001).

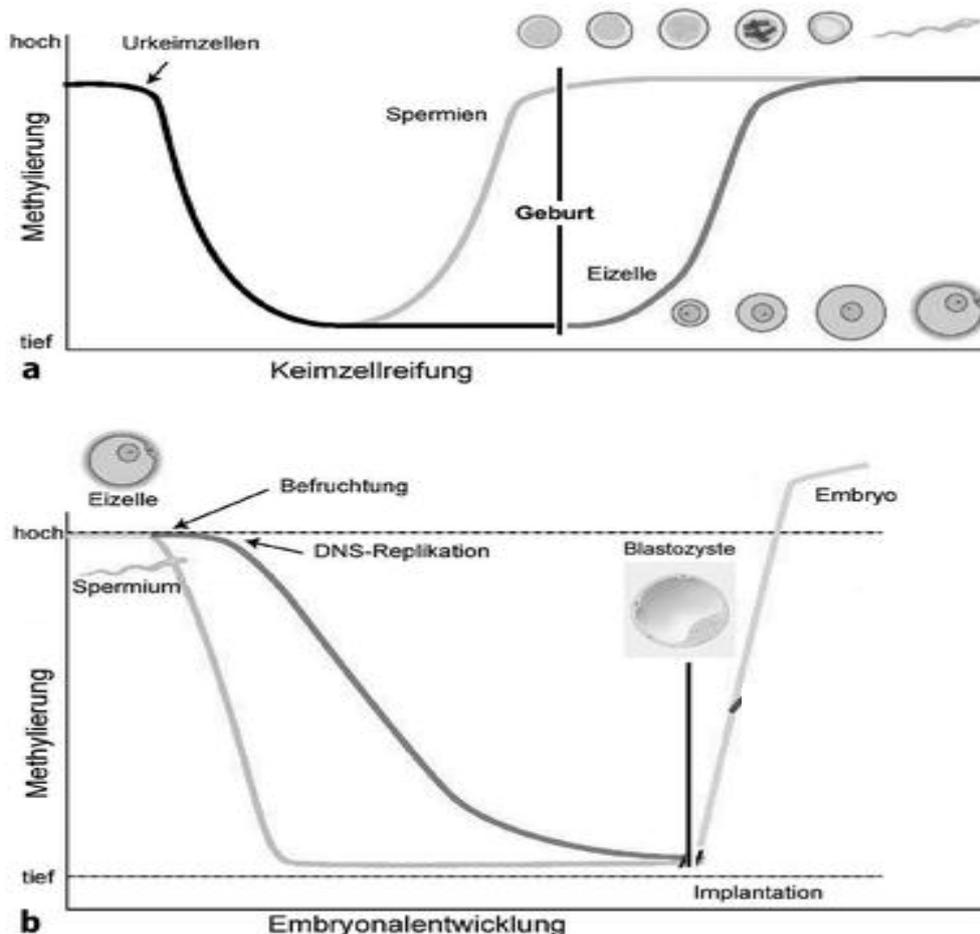
Das Entstehen des Methylierungsmusters ist ein dynamischer Prozeß, der in zwei Phasen stattfindet (Abb. 4):

## 1. Phase: Keimzellreifung

Mit Eintritt der Urkeimzellen in die undifferenzierte Genitalleiste wird die Demethylierung des gesamten Genoms induziert. Mit der weiteren Differenzierung zum Ovar bzw. zum Hoden kommt es zur Ausbildung der geschlechtsspezifischen Methylierung in den Oozyten bzw. Spermien. Während der Endausreifung wird das gesamte Genom methyliert, so dass die reifen Gameten transkriptionell relativ inaktiv sind. Bei den Spermien findet dies schon vorgeburtlich statt, bei den Eizellen erst präovulatorisch (Reik et al. 2001; Tada et al. 1997).

## 2. Phase: Embryonalentwicklung

Direkt nach der Befruchtung wird das paternale Genom schnell und aktiv demethyliert, das mütterliche Genom langsamer und passiv (Santos et al. 2002). Um die Zeit der Einnistung findet eine Welle von de novo Methylierung statt. Nach der Gastrulation bleiben die Methylierungsmuster relativ stabil.



**Abb. 4 Reprogrammierung der DNA-Methylierung** während der Keimzellreifung (a) und der Embryonalentwicklung (b) (modifiziert nach Reik et al. 2001).

Die DNA-Methylierung wird katalysiert von verschiedenen unabhängig voneinander arbeitenden Methyltransferasen (DNMTs) (Bestor 2000). Bei Mensch und Säugetier sind die bekanntesten Methyltransferasen DNMT1, DNMT3A und DNMT3B. Diese sind für die Entwicklung und Lebensfähigkeit von großer Bedeutung, da Knock-out-Mausmodelle aller drei Methyltransferasen intrauterin oder post partum versterben (Li et al. 1992; Okano et al. 1999).

Die genauen Mechanismen der präzisen Setzung und des Erhaltens der Methylierungsmuster sind bislang ungeklärt. Verschiedene Hypothesen gehen von speziellen DNA-Zielstrukturen über globale Methylierung mit spezifischer Antagonisierung bis hin zur Bindung von Methyltransferasen an Co-Repressoren oder Proteinkomplexe, die die Enzyme zu spezifischen Regionen auf dem Chromosom leiten, aus (Chen et al. 1998; Okano et al. 1999; Pradhan et al. 2002; Robertson et al. 2000; Rountree et al. 2000). Ein exaktes Zusammenspiel von Methyltransferasen, DNA-Struktur (Faktor in cis) sowie assoziierten Proteinen (Faktor in trans) scheint demnach unbedingt erforderlich zu sein.

### **1.3.3 DNA-Methylierung und Erkrankungen**

Die korrekte Weitergabe der epigenetischen Programierung im Genom ist für eine normale Entwicklung von großer Bedeutung (Reik et al. 2001; Robertson et al. 2000). Nach Bennett-Baker et al. wird der Einfluß epigenetischer Veränderungen in der Entstehung von Krankheiten weitaus höher eingeschätzt als die Entstehung somatischer Mutationen (Bennett-Baker et al. 2003). Methylierungsdefekte konnten mit verschiedenen Erkrankungen wie z.B. dem fragilen X- Syndrom, der Alpha-Thalassämie, dem Rett-Syndrom oder dem ICF-Syndrom in Zusammenhang gebracht werden (Oberle et al. 1991; Tufarelli et al. 2003; Kriaucionis et al. 2003; Okano et al. 1999; Hansen et al. 1999; Xu et al. 1999). Dabei führen vor allem Veränderungen in der DNA-Sequenz wie Basenpaarmutationen oder -deletionen, die selbst keine Funktionseinschränkungen verursachen, zu einem krankheitsauslösenden „sekundären epigenetischen Defekt“ (nach Horsthemke 2006).

**Imprinting-Erkrankungen:** Imprinting-Gene werden durch epigenetische Markierungen auf einem elterlichen Allel abgeschaltet und ermöglichen dadurch die Weitergabe allelspezifischer Expression an die Nachkommenschaft. Diese Markierung findet bereits

in den Gameten statt und wird während der Entwicklung aufrecht erhalten (Nicholls et al. 2001). Bisher sind ca. 80 solcher Gene identifiziert worden, die in verschiedenen Abschnitten des Genoms in Gruppen nebeneinander liegen. Diese Gruppen besitzen gemeinsame CpG-reiche Imprinting-Zentren, die auf dem mütterlichen und väterlichen Chromosom unterschiedlich methyliert vorliegen und die Expression der Gene innerhalb einer Gruppe kontrollieren. Deletionen und Translokationen innerhalb der Imprinting-Zentren führen zu veränderter DNA-Methylierung und Expression der benachbarten Imprinting-Gene (Brown et al. 1996; Lee et al. 1997; Reid et al. 1997; Walter et al. 2003). Neben diesen DNA-Sequenzveränderungen in cis konnte auch eine reine de novo-Methylierung in den Imprinting-Zentren gezeigt werden (Weksberg et al. 2002). Hierbei wird von einer fehlerhaften epigenetischen Reprogrammierung in der Keimzellreifung oder kurz nach der Befruchtung ausgegangen. Zusammenfassend stellen Imprinting-Erkrankungen Fehler in der Eltern-spezifischen Genaktivierung dar, die zu typischen Vererbungswegen von Gendefekten führen.

**Einfluß der DNA-Methylierung auf die Karzinogenese:** Schon in den achtziger Jahren wurde der Einfluß der DNA-Methylierung auf die Karzinogenese diskutiert. Inzwischen konnten über sechzig Gene mit somatisch veränderten Methylierungsmustern in Tumoren identifiziert werden ([www.3mdanderson.org/departments/methylation](http://www.3mdanderson.org/departments/methylation)). Veränderte Methylierungsmuster können unter anderem durch Hypermethylierung zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (z.B. *Rb*, *p16*, *p15*, *VHL*) oder durch Hypomethylierung zur Aktivierung von Proto-Onkogenen (z.B. *bcl-2*, *K-ras*) führen. Für die Tumorthapie werden bereits therapeutische Ansätze diskutiert, da mehrere Substanzen bekannt sind, die Einfluß auf die Methylierung nehmen können (Egger et al. 2004; Issa et al. 2004).

#### 1.3.4 Monozygote Zwillinge und Epigenetik

Wie weiter oben erwähnt, werden Unterschiede in der DNA-Methylierung als eine Möglichkeit für die Diskordanz von Erkrankungen und Phänotypen bei monozygoten Zwillingen diskutiert (Gringras et al. 2001; Petronis 2006; Singh et al. 2002; Wong et al. 2005), da diese einen möglichen Mechanismus darstellt, durch den es postzygotisch zu Unterschieden in zwei genetisch identischen Individuen kommen kann. Verstärkt wurde diese Hypothese durch Beobachtungen an geklonten Säugetieren. Trotz identischer Kern-DNA weisen geklonte Tiere eine hohe Phänotypenvariabilität auf. Es kommt zu

einer erhöhten Abort- und Fehlbildungsrate sowie zu einer gesteigerten Inzidenz von Imprinting-Erkrankungen. Veränderungen in der initialen Demethylierung während der Embryonalphase konnten gezeigt werden und werden als ursächlicher Faktor diskutiert (Dean et al. 2001; Reik et al. 2001).

In der bislang umfangreichsten epigenetischen Zwillingsstudie von Fraga et al. wurden globale und lokusspezifische Unterschiede in der DNA-Methylierung sowie Histonacetylierung H3 und H4 anhand von Lymphozyten an einer Kohorte von 40 monozygoten Zwillingspaaren untersucht (Fraga et al. 2005). Dabei zeigte sich, dass 65% der monozygoten Zwillinge hinsichtlich aller drei Parameter identisch waren, jedoch 35% starke Unterschiede aufwiesen. Diese Unterschiede zeigten sich verstärkt mit zunehmendem Alter sowie bei unterschiedlichen Lebensgewohnheiten, so dass von den Autoren ein Einfluß von Umweltfaktoren auf den Phänotyp bei gleichem Genotyp in den Vordergrund gestellt wurden. Unterschiede bei der Geburt können die Diskordanz angeborener Erkrankungen erklären.

Beim Beckwith-Wiedemann-Syndrom konnte bei 5 monozygoten diskordanten Zwillingspaaren ein Imprinting-Defekt bei dem jeweils erkrankten Zwilling im *KCNQ10T1*-Gen in Fibroblasten nachgewiesen werden (Weksberg et al. 2002).

Im Juli 2006 zeigten Oates et al. Methylierungsunterschiede bei einem diskordanten monozygoten Zwillingspaar mit Cauda-Duplikation (Oates et al. 2006). Dies ist die erste Publikation, die einen Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Organmalformation in einem Gen herstellen konnte, das weder auf dem X-Chromosom liegt noch eine allelspezifische Methylierung wie Imprinting-Gene zeigt. Dabei zeigte sich eine erhöhte Methylierung in der Promotorregion des Kandidatengenes *AXIN1* bei dem betroffenen Zwilling gegenüber dem gesunden Zwilling. In vitro-Daten konnten zeigen, dass die untersuchte CpG-Insel als Promotor fungiert und dessen Aktivität proportional invers zur Methylierung ist. Die Arbeitsgruppe postuliert, dass durch die Hypermethylierung *AXIN1* inaktiviert wird und dies zur Ausbildung der Erkrankung geführt haben könnte.

## 2 Herleiten einer Aufgabenstellung

Die Schilddrüsendysgenesien bilden die weitaus größte Gruppe der konnatalen Hypothyreosen. Die Ursache bleibt bislang in den meisten Fällen ungeklärt. Neben einigen familiär beschriebenen Fällen treten die Schilddrüsendysgenesien überwiegend sporadisch auf. Dieses sporadische Auftreten wird bei der Mehrzahl von Organmalformationen beobachtet. In den bisher bekannten Kandidatengen, die zu einer Schilddrüsendysgenese führen können, konnten nur wenige Mutationen nachgewiesen werden. Bei den insgesamt seltenen familiären Fällen findet sich eine hohe Phänotypenvariabilität. Monozygote Zwillinge erweisen sich in der Regel hinsichtlich ihrer Erkrankung an konnataler Hypothyreose als diskordant. Daher ist eine klassische Vererbung nach Mendel in der Mehrzahl der Fälle unwahrscheinlich. Auch andere Hypothesen, die für das sporadische Auftreten diskutiert werden, wie eine multigenetische Vererbung oder eine fehlende Weitervererbung aufgrund geringerer Fertilität verlieren unter Berücksichtigung dieser Daten an Bedeutung.

Eine Hypothese zur Erklärung des sporadischen Auftretens sowie der Diskordanz monozygoter Zwillinge könnte in einem epigenetischen Fehler im Sinne einer veränderten DNA-Methylierung in einem der Kandidatengene der konnatalen Hypothyreose liegen.

Die DNA-Methylierung ist ein dynamischer Prozeß, der postzygotisch in der frühen Embryonalentwicklung starken Schwankungen unterliegt. Eine veränderte DNA-Methylierung als epigenetischer Mechanismus konnte bereits mit der Entstehung von Krankheiten in Zusammenhang gebracht werden. Eine fehlerhafte Reprogrammierung der DNA-Methylierung in der Embryonalphase könnte das Auftreten sporadischer Erkrankungen sowie die Diskordanz von monozygoten Zwillingen bei konnataler Hypothyreose erklären.

Obwohl inzwischen generell akzeptiert ist, dass eine epigenetische Kontrolle für eine normale Entwicklung nötig ist, gibt es kaum Publikationen, bei denen die Methylierung spezifischer, während der Embryonalentwicklung aktiver Gene untersucht worden ist.

Der weitaus größere Teil der Patienten mit konnataler Hypothyreose zeigt eine Organmalformation im Sinne einer Dysgenese, die sich auf einen frühen Entwicklungsdefekt zurückführen lässt. Während spezifischer Entwicklungsstadien sind spezifische Gene aktiv: Für die frühe Schilddrüsenentwicklung sind mehrere

Transkriptionsfaktoren bekannt, von denen keiner ausschließlich in der Schilddrüse exprimiert wird. Syndromale Erkrankungen sind zwar bekannt, jedoch liegt der größte Teil der konnatalen Hypothyreosen isoliert vor. *Pax8* ist bislang der einzige Transkriptionsfaktor bei dem die Mehrzahl der beschriebenen Mutationen beim Menschen trotz Expression in der Niere und dem ZNS zu einer isolierten konnatalen Hypothyreose führt. *Pax8* stellt das beste Kandidatengen für eine DNA-Methylierungs-Analyse dar, weil eine Haploinsuffizienz bei bisher gefundenen Mutationen dem Phänotyp der sporadisch nicht syndromalen Schilddrüsendysgenese am besten entspricht. Die Hypothese zur Erklärung der konnatalen Hypothyreose bei Schilddrüsendysgenese, die in dieser Arbeit verfolgt wurde, geht davon aus, dass Unterschiede in der Methylierung eines Transkriptionsfaktors bei Patienten mit Schilddrüsenfehlbildungen vorhanden sind, die ebenfalls zu einem Transkriptionsverlust und damit zu einem ähnlichen Phänotyp wie bei Patienten mit einer Haploinsuffizienz führen können.

Daten über die DNA-Methylierung auf Sequenzebene sind bislang nur für wenige Abschnitte des Genoms bekannt. Die Kenntnis der Wildtypmethylierung ist jedoch unbedingt erforderlich, um mögliche Varianten in genassoziierten Krankheiten erfassen zu können. Kürzlich brachte eine Arbeit von Eckhardt et al. diesbezüglich große Fortschritte, die im Rahmen des Humanen Epigenom-Projektes (HEP) 2.524 Amplikons von 43 verschiedenen DNA-Proben aus 12 verschiedenen Geweben auf den Chromosomen 6, 20 und 22 hinsichtlich der DNA-Methylierung analysierte (Eckhardt et al. 2006). Das HEP hat sich zum Ziel gesetzt, genomweit DNA-Methylierungsmuster in verschiedenen Geweben zu charakterisieren und zu katalogisieren. Bisher existieren keine Informationen über CpG-Inseln und DNA-Methylierung im Bereich des *PAX8*-Gens. Daher sollten folgende Fragen in dieser Arbeit beantwortet werden:

- 1) Gibt es im Bereich des humanen *PAX8* CpG-reiche Regionen und wo sind diese genau lokalisiert?
- 2) Wie sieht die Wildtypmethylierung in diesem Bereich beim Mensch aus? Daten über die DNA-Methylierung in diesem Sequenzabschnitt des Genoms sind bisher nicht bekannt, so dass die Methylierung an CpG-Dinukleotiden zunächst genauer charakterisiert werden sollte. Dies sollte anhand von Leukozyten-EDTA-Blut

---

mehrerer Kontrollpersonen erfolgen, um das Wildtypmuster sowie interindividuelle Schwankungen zu erfassen.

- 3) Gibt es ein in der Evolution konserviertes Methylierungsmuster an CpG-Inseln im Bereich des *Pax8*- Gens bei der Maus? Eine solche evolutionäre Konservierung würde für eine funktionelle Relevanz der Methylierungsmuster sprechen.
- 4) Gibt es gewebespezifische Unterschiede in der DNA-Methylierung beim Menschen? Intraindividuelle Unterschiede in verschiedenen Geweben sind beschrieben worden. In einer Arbeit konnten Unterschiede in der DNA-Methylierung mit spezifischer Gewebeexpression in Zusammenhang gebracht werden. Daher sollten die Methylierungsmuster gleicher Individuen in unterschiedlichen Geweben untersucht werden. Dies sollte neben dem Leukozyten-EDTA-Blut an gesundem Schilddrüsengewebe erfolgen. Als drittes Gewebe sollte aus Wangenschleimhautabstrichen gewonnenes Material dienen.
- 5) Gibt es Unterschiede in der DNA-Methylierung im *PAX8*-Gen zwischen Kontrollpersonen und Patienten mit Schilddrüsenfehlbildungen insbesondere mit konnataler Hypothyreose?
- 6) Gibt es Unterschiede in der DNA-Methylierung zwischen diskordanten, monozygoten Zwillingen, die an konnataler Hypothyreose erkrankt sind?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen
Ammoniumacetat	Merck
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Aqua ad iniectabilia	Braun
Betain	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chelating Resin (Chelex 100)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Amersham Pharmacia, Little Chalfont, England
DNA-Größenmarker (1 kb DNA-Ladder)	Promega, Mannheim
Ethanol 96% reinst	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glykogen	Boehringer, Mannheim
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Heavy Mineral Oil	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Hydrochinon	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumdisulfit (Natriummetabisulfit)	Merck, Darmstadt
Sea Plaque Agarose	Bio Whittaker Molecular Application
SDS	Merck, Darmstadt

TRIS	Biomedicals
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid)	Sigma, Deisenhofen
<i>3.1.1.1 Kits</i>	
A-Addition-Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp blood DNA mini kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Big Dye Terminator Cycle Sequencing (v 3.1)	Applied Biosystems, California, USA
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Wizard DNA Clean-Up-Kits	Promega, Mannheim
Topo-Kit (pcr 2.1-Topo)	Invitrogen, Carlsbad, USA

*3.1.1.2 Enzyme*

AmpliTaq-DNA-Polymerase	Perkin Elmer, Landen
Bioline-Taq-Polymerase	Bioline
EcoR1	New England Biolabs, Schwalbach
Exonuklease 1	New England Biolabs, Schwalbach
ECO R1	New England Biolabs, Schwalbach
HIND III	New England Biolabs, Schwalbach
PfuTurbo-DNA-Polymerase	Stratagene, Europe
Proteinase K	Invitrogen
Sap (Shrimp Alkaline Phosphatase)	New England Biolabs

*3.1.1.3 Oligonukleotide*

Die Oligonukleotide wurden von der Firma TIB Molbiol, Berlin sowie Thermo Hybaid, Ulm hergestellt.

**3.1.2 Lösungen und Medien**

LB-Flüssigmedium:

Trypton 10 g/l

Hefeextrakt 5g/l

NaCl 5g/l  
In H<sub>2</sub>O pH 7,4

LB-Agarplatte:  
Agar-Agar:1,5% in LB-Flüssigmedium, pro ml LB-Flüssigmedium 75 µg Ampicillin

SOB-Flüssigkeitsmedium:  
Trypton 20 g/l, Hefeextrakt 5g/l, NaCl 0,5 g/l  
KCl 2,6 mM in H<sub>2</sub>O pH 7,0

SOC-Flüssigmedium:  
nach Hitzesterilisation zu 500 ml SOB geben: 5ml 2M MgCl<sub>2</sub>, Steril in H<sub>2</sub>O  
10 ml 1 M Glucose, steril in H<sub>2</sub>O

X-Gal:  
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β-D Galaktopyranoside  
0,1 mg in 5ml Dimethylformamid lösen

Loading Dye für Agarosegele:  
Bromphenolblau 0,25%  
Xylenglycerol 0,25%  
Glycerol 25% in H<sub>2</sub>O

10X TBE:  
Tris 0,89 M  
H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,89 M  
EDTA (H 8,0) 0,02 M

TE, EDTA, SDS, Tris-HCL, NaOH (nach Sambrook et al. 2001).

### 3.1.3 Geräte

Brutschrank:	Certomat BS-1, Braun, Biotech Internation
Feinwaage	VWR
Gelelektrophorese	Biometra
pH-Meter:	WTW
Photometer:	BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg
Sequenzier:	ABI 373, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Thermocycler:	Biometra UNO-Thermoblock, Biometra, Göttingen Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg

---

	Gene Amp, Applied Biosystems,
Thermoschüttler:	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge:	Centrifuge 5417 R/C, Eppendorf, Hamburg
UV-Kamera	Geneflash Syngene, Bio Imaging, Hamatsu
Vortexer	Bender & Hobein AG, Zürich Schweiz
Waage	Sartorius
Zentrifuge	Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg

## **3.2 Auswahl der Proben**

### **3.2.1 Auswahl der Kontrollpersonen**

Für die Analyse der normalen DNA-Methylierung dienten periphere Leukozyten (LZ) aus EDTA-Vollblut von adulten Probanden, bei denen keine Schilddrüsenerkrankung bekannt war.

Für einen intraindividuellen Vergleich des Methylierungsmusters wurden von jeweils derselben Person Schilddrüsengewebe, Leukozyten-EDTA-Blut und Wangenschleimhautabstriche gewonnen. Hierbei handelte es sich um Patienten mit einer lokalen Schilddrüsenerkrankung wie ein SD-Adenom oder SD-Karzinom bei unauffälligem Restgewebe. Bei dem hier untersuchten SD-Material handelt es sich ausschließlich um pathologisch unauffälliges SD-Gewebe. Die Studie wurde von der örtlichen Ethikkommission genehmigt. Jeder Patient erhielt eine Patienteninformation und gab sein schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie.

Zusätzlich wurden postoperative DNA-Proben von SD mit verschiedenen Pathologien (Struma nodosa, M. Basedow) untersucht.

### **3.2.2 Auswahl der Patienten mit konnataler Hypothyreose**

Ausgewählt wurden Patienten mit einer Schilddrüsendysgenese, die in Form einer Agenesie, einer Ektopie, einer Hemithyroidea oder einer Hypoplasie vorliegen konnte. In der Mehrzahl der Fälle wurde die Diagnose im Neugeborenen-Screeningprogramm Berlin gestellt (Grüters et al. 2007; Grüters et al. 1997). Bei einigen Patienten mit Hemithyroidea wurde die Diagnose zufällig im Ultraschall gestellt.

### 3.2.3 Auswahl der Zwillinge

Die untersuchten Zwillingspaare werden in der Pädiatrischen Endokrinologie der Charite Berlin sowie in anderen pädiatrisch-endokrinologischen Zentren betreut (Tabelle 2).

Zwillingpaar	Zygotie	Geschlecht	CH-Konkordanz	Diagnose erkrankter Zwilling	SD-Morphologie erkrankter Zwilling
Nr. I	monozygot	männlich	diskordant	Primäre CH	Hypoplasie
Nr. II	dizygot	männlich	diskordant	Primäre CH	Hypoplasie
Nr. III	monozygot	weiblich	diskordant	Primäre CH	Hypoplasie
Nr. IV	monozygot	weiblich	diskordant	Primäre CH	Ektopie
Nr. V	monozygot	weiblich	diskordant	Primäre CH	Athyreose-Hypoplasie

**Tabelle 2 Übersicht der untersuchten Zwillingspaare**

Alle Zwillingspaare sind hinsichtlich ihrer konnatalen Hypothyreose diskordant. Die nicht betroffenen Zwillinge der Paare Nr. I-IV sind schilddrüsengesund. Der euthyreote Zwilling des Paares Nr. V zeigt eine fragliche Hemithyroidea in der Sonographie.

### 3.2.4 Auswahl der Mäuse

Für die Analyse der Wildtypmethylierung bei der Maus diente als DNA-Ausgangsmaterial Mäuseschwanz, periphere Leukozyten aus EDTA-Vollblut sowie Schilddrüsengewebe verschiedener Wildtypmäuse (Mausstamm Black 10).

## 3.3 Genomische Analysen

### 3.3.1 Genomisches Mutationsscreening

Das humane *PAX8*-Gen liegt auf dem Chromosom 2 Position 2q12-q14 und besteht aus 12 kodierenden Exons. Bei allen untersuchten Patienten mit konnataler Hypothyreose sowie bei allen Zwillingspaaren war das Mutationsscreening in den kodierenden Bereichen des *PAX8*-Gens zuvor durchgeführt worden und ohne Mutationsnachweis geblieben.

### 3.3.2 Homologiestudien und CpG-Inseln

Homologiestudien zwischen Mensch und Maus wurden in der Region des *Pax8*-Gens mit Hilfe der Datenbank NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) sowie der PipMaker-Software durchgeführt (<http://bio.cse.psu.edu>).

CpG-Inseln in der zu untersuchenden Sequenz wurden ebenfalls mittels PipMaker-Software identifiziert (Schwartz et al. 2000)

### 3.3.3 Umschreiben der genomischen Sequenz

Die genomischen *Pax8*-Sequenzen wurden in für die Bisulfitumwandlung typische Sequenzen (siehe 3.5) umgeschrieben. Hierbei wurden die CpG-Dinukleotide in der Arbeits-Sequenz als CG dargestellt, alle übrigen Cytosine wurden durch ein gekennzeichnetes Thymin ersetzt. Dies ist notwendig, um zum einen die Primer für die PCR wählen zum anderen den Methylierungsgrad der CpG-Dinukleotide anhand späterer Sequenzen auswerten zu können

## 3.4 DNA-Isolation

### 3.4.1 DNA-Isolation aus Leukozyten

Die DNA-Extraktion peripherer Leukozyten aus EDTA-Vollblut wurde laut Qiagen-Protokoll durchgeführt.

### 3.4.2 DNA-Isolation aus Wangenschleimhaut

#### 3.4.2.1 Vorbereitung des Isolationskits und der Probe

Zunächst wurde eine 10%ige Chelexlösung (z.B. 25g Chelex in 250ml Wasser lösen) als Isolationskit hergestellt. Die Chelexlösung wurde mit einer Spritze aufgezogen und zu je acht Tropfen in ein Eppendorf-Gefäß portioniert. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Abstrichbürste durch Bürsten an der Wangenschleimhaut gewonnen. Anschließend wurde die Bürste sorgfältig in dem Isolationskit ausgestrichen.

#### 3.4.2.2 DNA-Extraktion

Die Probe wurde für 30 Minuten in einem Heizblock inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei 2000 Umdrehungen/min. zentrifugiert. Die Probe wurde weitere 16 Minuten bei 95° im Heizblock inkubiert und anschließend kurz unter kaltem Wasser abgekühlt. Nach weiteren 5 Minuten Zentrifugieren bei 12000 Umdrehungen/min wurde der entstandene Überstand mittels einer Pipette aufgezogen, abgemessen und in ein neues

Eppendorf- Gefäß gegeben. Anschließend erfolgte eine Probenaufreinigung (laut Protokoll des Extraktionskitherstellers Quiagen).

### **3.4.3 DNA-Isolation aus Gewebe:**

#### *3.4.3.1 Vorbereitung des Isolationspuffers und der Probe*

Für jede Probe wurden 200 µl Puffer benötigt. Der Puffer setzt sich aus 0,05M TrisCl (pH 8), 0,1M EDTA, 0,5% SDS und 0,1% Proteinase K zusammen. Es wurden ca. 25 mg des zu untersuchenden Gewebes mit der Feinwaage abgemessen. Anschließend wurde die Probe mit einem sterilen Skalpell zerkleinert.

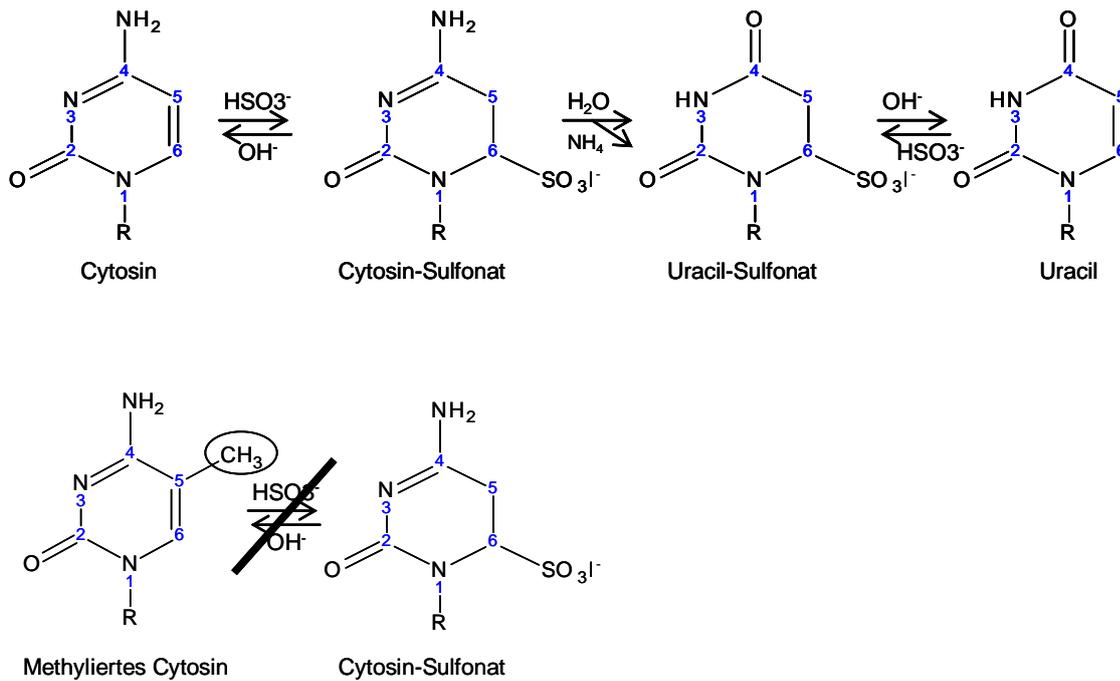
#### *3.4.3.2 DNA-Extraktion*

Die Gewebeprobe wurde in dem Isolationspuffer über Nacht bei 56° inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Ethanol-fällung bei 4°C mit 1000 µl reinem Ethanol, 150 µl NH<sub>4</sub>AC und 2 µl Glykogen bei 13000 U/min für 30 min. Anschließend wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das entstandene DNA- Pellet wurde bei 37°C getrocknet und anschließend in 200 µl HPLC-Wasser aufgenommen. 200 µl Phenol-Chloroform-Wasser wurden zugegeben, das Gemisch wurde geschüttelt und zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert und mit 200 µl Chloroform gemischt und zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine erneute Ethanol-fällung durchgeführt. Das DNA-Pellet wurde bei 37° getrocknet und anschließend in 50 µl HPLC-Wasser aufgenommen.

Anschließend erfolgte die Messung der DNA-Konzentration am Photometer.

## **3.5 Natriumbisulfitbehandlung genomischer DNA**

Durch die Natriumbisulfitbehandlung, anschließender PCR, Einklonierung und Sequenzierung lässt sich der Methylierungszustand einzelner Moleküle in einem bestimmten Sequenzabschnitt indirekt untersuchen. Diese Methode wurde erstmals von Frommer et al. beschrieben. Zahlreiche Abwandlungen sind seitdem in der Literatur beschrieben worden (Clark et al. 1994; Feil et al. 1994; Olek et al. 1996; Paulin et al. 1998; Raizis et al. 1995). Die Natriumbisulfitbehandlung führt zu einer Umwandlung von nicht methyliertem Cytosin zu Uracil, welches in der anschließenden PCR- Reaktion und Sequenzierung als Thymin erkannt wird. Eine Methylierung an Position C5 des Pyruvatringes des Cytosins verhindert eine Umwandlung zu Uracil (Abb. 5).



**Abb. 5 Biochemie der Bisulfitreaktion:**

a) Umwandlung von Cytosin zu Uracil unter Bisulfitbehandlung; b) Methylgruppe am 5mC verhindert die Reaktion

Die Reaktion ist hochselektiv, nur 2-3% der 5-Methyl-Cytosine (5mC) werden zu Thymin umgewandelt (Wang et al. 1980).

Die Natriumbisulfitbehandlung wurde überwiegend nach dem Protokoll von Hajkova et al. durchgeführt (Hajkova et al. 2002), das eine leicht modifizierte Form des Protokolls nach Olek et al. darstellt (Olek et al. 1996). Durch diese Methode, die auf einer Bindung der DNA an eine Agarosegelmatrix beruht, sind Untersuchungen kleinster DNA-Mengen möglich.

### 3.5.1 Suche nach „Single-Nucleotide-Polymorphisms“ (SNPs)

Zur Kontrolle, ob beide Allele in der anschließenden Methylierungsanalyse repräsentiert werden, wurden die zu untersuchenden Abschnitte der CpG-Inseln auf genomischer Ebene mittels PCR und anschließender Sequenzierung nach SNPs untersucht. Zu beachten war, dass ein Cytosin zu Thymin oder ein Thymin zu Cytosin-Polymorphismus sich in einer Bisulfit-umgewandelten Sequenz nicht bemerkbar gemacht hätte, da diese beide in der Sequenzierung als Thymin erscheinen. Es wurde ein SNP in hCpG-1 sowie in hCpG1.3 (siehe 3.6) identifiziert, die bei einigen Personen in heterozygoter Form vorlag und so als interne Kontrolle dienen konnten (Tabelle 3).

Fragment	SNP	Primer	Annealingtemperatur (°C)	PCR- Fragmentlänge(bp)
hCpG-1	+T	F: 5'CCA AGT ACC ATC CGC TCT CGC TCG3'  R: 5'CCT CCC TCG GCG CCG CCA ACC CTC CCT3'	65	205
hCpG1.3	G zu A	F: 5'GTG AGC TCC CCG CAT CTC TCA AG 3'  R: 5'CAT GGC CCT GGG ACT GGA GA 3'	65	587

**Tabelle 3 SNPs**

Primer und PCR-Parameter

### 3.5.2 Enzymverdau der genomischen DNA

Um unspezifische Bindungen innerhalb der DNA zu verringern wurde zunächst ein Enzymverdau der genomischen DNA durchgeführt. Hierzu wählt man anhand der genomischen Sequenz ein Enzym, das häufig im Genom schneidet jedoch nicht in dem Bereich, der später mittels PCR amplifiziert werden soll. Für alle humanen Fragmente sowie für mCpG-1 und mCpG2 wurde ECOR1 gewählt, für mCpG1 wurde HIND III eingesetzt. Für den Enzymverdau wurden maximal 700 ng DNA eingesetzt und zusammen mit 2 µl Puffer, 1 µl Enzym (20000 Units) und HPLC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 21 µl aufgefüllt. Die DNA wurde bei 37°C für zwei Stunden enzymatisch verdaut.

### 3.5.3 Herstellen der Natriumbisulfitlösung

Für die Herstellung einer 2,5M Natriumbisulfitlösung (pH 5,0) wurden 55 mg Hydrochinon in 500 µl H<sub>2</sub>O bei 50°C gelöst und 1,9 g Natriumbisulfit in 2,5 ml H<sub>2</sub>O und 750 µl 2M NaOH gelöst. Beide Lösungen wurden gemischt und zu je 1 ml in 2 ml Eppendorf-Gefäße portioniert, mit je 750 µl schwerem Mineralöl beschichtet und aufgrund der Lichtempfindlichkeit von Bisulfit und Hydrochinon abgedunkelt für zwei Stunden auf Eis gekühlt.

#### 3.5.3.1 Denaturierung

Die Bisulfitreaktion findet nur an einzelsträngiger DNA statt (Abb. 6). Daher wird die DNA bei 95°C für 5 Minuten denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt.

Zusätzlich erfolgt eine alkalische Denaturierung mit 4 µl 2M NaOH (Endkonzentration 0,3 M NaOH) bei einer Inkubation von 15 Minuten bei 50° C.



Abb. 6 Bisulfitumwandlung auf Sequenzebene

### 3.5.3.2 Umwandlung der genomischen DNA

Die Sea-Plaques- Agarose wurde bei 65°C in Wasser gelöst, so dass eine zweiprozentige Agarose entsteht. 50 µl der gelösten Agarose wurden zu der Probe gegeben. Bis zu sieben 10 µl- Aliquots des DNA-Agarose-Gemisches wurden in ein mit Öl und Bisulfitlösung vorbereitetes Eppendorf-Gefäß pipettiert. Durch den Eintritt des warmen DNA-Agarose-Gemisches in das kalte Öl bildet sich eine feste Kugel, die langsam nach unten in die Bisulfitlösung sinkt (Abb. 7).

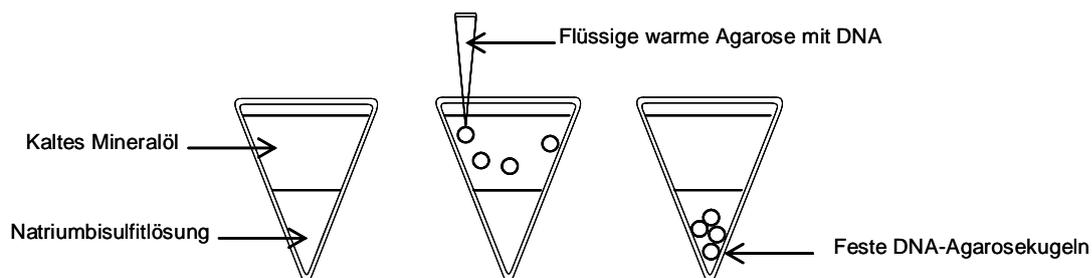


Abb. 7 Herstellung von DNA-Agarosekügelchen

Die Proben wurden für 30 Minuten auf Eis gekühlt. In dieser Phase wird das Cytosin sulfoniert, indem ein Bisulfition ( $\text{SO}_3^-$ ) an die Position 6 des Cytosins angehängt wird (Abb. 5). Dieser Schritt wird durch niedrige Temperaturen sowie einen pH-Wert unter 7 begünstigt und hat nach ca. 20 Minuten sein chemisches Gleichgewicht erreicht.

Die Kugeln wurden anschließend abgedunkelt bei  $50^\circ\text{C}$  für 5 Stunden inkubiert. Durch die erhöhte Temperatur sowie die hohe Konzentration an Natriumbisulfit wird die Aminogruppe an Position 4 des Cytosin-Sulfonates instabil und Cytosin-Sulfonat deaminiert irreversibel zu Uracil-Sulfonat. Auch dieser Schritt wird durch einen pH-Wert unter 7 begünstigt.

Zum Schluss wurden die Kugeln dreimal für 10 Minuten mit 1x TE-Puffer (pH8), zweimal für 15 Minuten mit 0,2M NaOH und dreimal für 10 Minuten mit 1xTE-Puffer (pH8) gewaschen. Die damit verbundene Erhöhung des pH-Wertes führt zu einer Desulfonierung, wodurch das Uracil-Sulfonat zu Uracil umgewandelt wird. Vor der PCR wurden alle Kugeln zweimal für 15 Minuten mit HPLC-Wasser gewaschen.

#### **3.5.4 Alternative Natriumbisulfitbehandlung**

Für einige Proben wurde zusätzlich ein zweites Bisulfit-Protokoll nach Zeschnigk et al. (1997) modifiziert nach Clark et al. (1994) verwendet, das ohne Agarose-Kugeln durchgeführt wird aber deutlich höhere Ausgangsmengen an DNA benötigt. Dazu wurden 2  $\mu\text{g}$  DNA mit HPLC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Diese wurde zunächst alkalisch mit 5,5  $\mu\text{l}$  3M NaOH (0,3M Endkonzentration) bei  $37^\circ\text{C}$  für 15 Minuten denaturiert und anschließend für 2 Minuten bei  $95^\circ\text{C}$  Hitze-denaturiert. Die Bisulfitlösung wurde in einem Endvolumen von 20 ml hergestellt. Dazu wurden 8,5 g Natriumbisulfit in 15 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Anschließend wurden 0,9 ml Hydrochinon (50mM) und 1000  $\mu\text{l}$  10M NaOH (pH 5,0-5,3) zugegeben. Die denaturierte DNA wurde zusammen mit 500  $\mu\text{l}$  der Bisulfitlösung für 16-20 Stunden abgedunkelt bei  $50^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Aufreinigung dieser Proben erfolgte nach Protokoll des Wizard DNA Clean-Up-Kits. Für die anschließende PCR wurden 3  $\mu\text{l}$  umgewandelter DNA eingesetzt.

## 3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

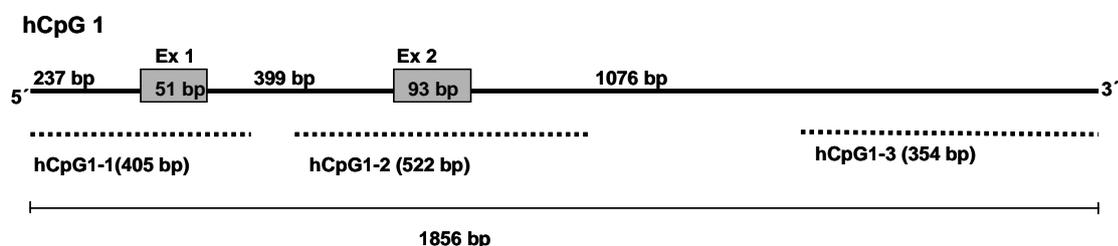
### 3.6.1 Primer und Primerdesign

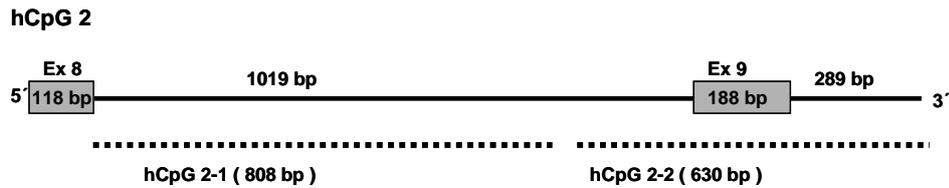
Nach der Bisulfitbehandlung sind die beiden DNA-Stränge nicht mehr zueinander komplementär, so dass die Primer anhand der umgewandelten Sequenzen strangspezifisch gewählt werden (Abb. 6).

Da ein großer Teil der Cytosine nach der Bisulfitumwandlung in Uracil umgewandelt wird, steigt die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Bindungen in der PCR, wodurch sich der Einsatz von langen Primern (25 bis 30 bp) sowie die Durchführung einer „nested“ oder „seminested“ PCR mit einem zweiten Primerpaar als vorteilhaft erwiesen hat.

Durch die Bisulfitmethode erfolgt keine hundertprozentige Umwandlung der DNA. Um eine Amplifizierung nicht umgewandelter genomischer DNA zu vermeiden, sollten die Primer umgewandelte Cytosine in ihrer Sequenz enthalten, so dass eine spezifische Bindung an die Bisulfit-umgewandelte DNA erfolgt. Die Primer sollten keine CpG-Dinukleotide in ihrer Sequenz beinhalten, da nicht vorhersehbar ist, ob das Cytosin durch die Bisulfitumwandlung zu einem Uracil umgewandelt wird.

Um eine erfolgreiche Amplifizierung des gewünschten Abschnitts in der PCR nach der Bisulfitbehandlung zu erzielen, sollten die Fragmente eine Länge von 600 Basenpaaren nach Möglichkeit nicht überschreiten. Aus diesem Grund wurden aus den Bereichen hCpG1 und hCpG2 die Fragmente hCpG1.1, hCpG1.2, hCpG1.3, hCpG2.1 und hCpG2.2 gewählt (Abb. 8). Das Fragment hCpG1.3 wurde alternativ als langes oder kurzes Fragment amplifiziert bei unterschiedlichen Vorwärts- und gleichen Rückwärtsprimern. Die Auswertung des langen Fragments erfolgte nur in dem 3'-Bereich, der auch durch das kürzere Fragment erfaßt wurde.





**Abb. 8 Position der Fragmente hCp1.1, hCpG1.2, hpG1.3, hCpG2.1, hCpG2.2**

**Primer für die Amplifizierung Bisulfitumgewandelter DNA der Bereiche hCpG-1, hCpG1, hCpG2:**

**hCpG -1:**

hCpG -1 Fout: 5'GTG GAT GTA TTT TTG GGA GGA AAT TAA GTA T 3'

hCpG -1 Fin: 5' TTT AGT GAG TTT TTT AAT TTT GTT TA 3'

hCpG -1 Rout: 5'TTT ACT TCC TTT CTC TAA ACT CCC CTA AC 3'

hCpG -1 Rin: 5' TAT TTT CCT CTC TTT ATC TCT TC 3'

**hCpG 1.1:**

hCpG 1.1 Fout: 5'GGA TTT AGA GAA TTT TAT TTT TAG G 3'

hCpG 1.1 Rout: 5'CTA AAA AAA CTC CAA ACT CCA AC 3'

hCpG 1.1 Fin: 5' GTT TGT TGA GTT AGG GTT TAG TTG 3'

hCpG 1.1 Rin: 5'AAC TAC CAA ACA TCC TAA AAC CCT 3'

**hCpG 1.2:**

hCpG 1.2 Fout: 5'GGA GGT TGG AGT TTG GAG TTT TTT TAG 3'

hCpG 1.2 Rout: 5'CCA ACC AAA AAA ATC ACT AAA AAA AAC TAC 3'

hCpG 1.2 Fin: 5'GTT AGG TTA GGT TGA GGT TGG TTT TAT 3'

hCpG 1.2Rin: 5'CTC TAA CTC CAC AAA AAT CCC CTC AC 3'

**hCpG 1.3:**

hCpG1.3 Fout: 5' GTT TTT TTT AGT GAT TTT TTT GGT TGG 3'

hCpG1.3 Fin: 5' AGT GAT TTT TTT GGT TGG ATT GTG AG 3'

hCpG1.3b Fout: 5' GTA GGG TTT TTG TTG GGA AAG GAG 3'

hCpG1.3b Fin: 5' GAG TTT TAG GGT TAG GGT TGG TG 3'

hCpG1.3 Rout: 5' CTC CCC TCC TAA TTA AAC CAT AAC 3'

hCpG1.3 Rin: 5' AAC CAT AAC CCT AAA ACT AAA AAC TAC 3'



mCpG1.1 Fin: 5' GTG GTA GTT AGA GTT GTT AGG ATT TG 3'

mCpG1.1 Rin: 5' CAA CTT AAA ATT TTC TCA CCC TAC CC 3'

#### **mCpG 1.2:**

mCpG1.2 F: 5' GGG TTT TTA GAG TTT TTG AGT TTT TTG TA 3'

mCpG1.2 Rout: 5' CTT CAT ATT TAC AAA AAA TTC ATC TAA AAT AT 3'

mCpG1.2 Rin: 5' TCA TCT AAA ATA TTA ATT TCC TCT CAC TC 3'

#### **mCpG 2:**

mCpG2 Fout: 5' TTT ATT TGG ATT TTA TTG TGA GGG TTA 3'

mCpG2 Rout: 5' ACT AAT TCT AAC TCC TAA CTT CTC CCA TAA A 3'

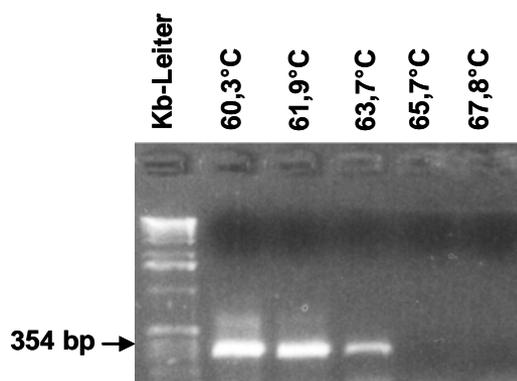
mCpG2 Fin: 5' TAG TAT GGG TTT GGG GGT AGG AGG AGG T 3'

mCpG2 Rin: 5' CTC AAA CAA AAA AAC TTA ACC TCC CT 3'

### **3.6.2 PCR der Bisulfit-umgewandelten DNA**

Für die erste PCR wurde eine DNA-Agarose-Kugel mit umgewandelter DNA eingesetzt, die maximal 100 ng DNA enthielt. Für die „nested“ oder „seminested“ PCR wurden 2 µl der ersten PCR eingesetzt.

Mit Hilfe eines Gradientencyclers wurden die PCR-Bedingungen für die verschiedenen Fragmente ermittelt (Abb. 10) (Tabelle 4).



**Abb. 10 Optimierung der PCR:**  
Beispiel einer Gradienten-PCR (Fragment hCpG1.3 kurz)

Fragment	Annealingtemperatur (°C)	PCR-Produktgröße (bp) (nested PCR)	Bemerkungen
hCpG-1	60,8	340	Taq-Polymerase/Betain
hCpG1.1	60	405	Taq-Polymerase/Betain
hCpG1.2	63	522	Taq-Polymerase/Betain
hCpG1.3	63	Lang:667 kurz:354	Pfu-Polymerase/Bioline-Polymerase 1:10
hCpG2.1	63	809	Taq-Polymerase/Betain
hCpG2.2	58	630	Taq-Polymerase/Betain
mCpG-1	61	373	Taq-Polymerase/Betain
mCpG1.1	60	204	Taq-Polymerase/Betain
mCpG1.2	60	275	Taq-Polymerase/Betain
mCpG 2	61	713	Taq-Polymerase/Betain

**Tabelle 4 PCR- Parameter** für die Fragmente nach Bisulfitemwandlung

### 3.7 Gelelektrophorese

Für das Gel (1%ig) wurde die Agarose zusammen mit 0,5%igem TBE-Puffer gemischt, erwärmt und anschließend mit 2 µl Ethidiumbromid (Fluoreszenzfarbstoff) pro 100 ml Suspension versehen. Die Gelflüssigkeit wurde bei circa 50° C in eine Gelkammer gegossen. Plastikkämme, die in das flüssige Gel gesteckt wurden, bildeten die späteren Einfülltaschen. 3 µl 1-kb-Referenz-DNA und je 5 µl PCR-Produkt mit 2 µl loading dye wurden in die Taschen pipettiert. Die Gel-Elektrophorese lief in 0,5%igem TBE-Puffer für ca. 20 Minuten bei 90 Volt. Anschließend konnte die amplifizierte DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert werden. Im Anschluß wurden die Proben direkt für die Sequenzierung vorbereitet oder zuvor einkloniert.

### 3.8 Klonierung des PCR-Produktes

Vor der Einklonierung wurde das PCR-Produkt über Säulen nach Quiagen-Protokoll aufgereinigt und mit 30 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

#### 3.8.1 Ligation

Für die Einklonierung ist es notwendig, dass das PCR-Produkt 3´A-Überhänge besitzt. Die Taq-Polymerase generiert am 3´-Ende der PCR-Produkte einzelne Deoxyadenosine. Alternativ wurde mit dem A-Addition-Kit von Quiagen nach Protokoll

gearbeitet. Das PCR-Produkt wurde mit einem kommerziellen Topo-Kit (pCR2.1-Topo) inkloniert. Dieser ermöglicht eine schnelle Einklonierung in einen Vektor. Der Vektor liegt in linearisierter Form vor und besitzt singuläre Thymidinanhänge am 3'-Ende, der kovalent an eine Topoisomerase 1 aus dem Vaccinia Virus gebunden ist. Die 3'-Überhänge des PCR-Produktes können so an die 3'-T-Überhänge des Vektors ligiert werden. Dazu wurden 2 µl Template, 2 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl Vektor in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und bei Raumtemperatur für 10 Min. inkubiert.

### **3.8.2 Transformation**

Das Plasmid wurde anschließend in Escherichia Coli-Zellen transformiert. Dazu wurden 50 µl kompetente Zellen zu dem Ligationsansatz gegeben und für 45 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 2 Min. bei 42°C geschockt, mit 250 µl SOC-Medium versehen und bei 37°C im Brutschrank für 45 Min. inkubiert. Die vorbereiteten Ampicillin-haltigen LB-Platten wurden mit 40 µl X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktopyranoside) beschichtet und für eine halbe Stunde im Brutschrank getrocknet. Anschließend wurde der Ansatz auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet.

### **3.8.3 Selektion der Insertenthaltenden Klone**

Durch das Vorhandensein der LacZalpha-Einheit im Vektor und des chromogenen Substrats X-Gal können die Kolonien, die das Insert enthalten, anhand des Blau-Weiß-Screenings leicht selektioniert werden. In Anwesenheit von Beta-Galaktosidase, wird das X-Gal hydrolysiert und gibt ein Präzipitat, das die Kolonie blau erscheinen lässt, ist hingegen die Beta-Galaktosidase durch das Insert zerstört, erscheint die Kolonie weiß. Die weißen Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze gepickt und in je 10 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

Die weitere Aufarbeitung der Proben erfolgte nach dem Protokoll von Quiagen zur Aufbereitung von Minipräps oder mittels Kolonie-PCR.

### **3.8.4 Kolonie-PCR**

Die Kolonie-PCR wurde in einem 30 µl-Ansatz mit 2 µl des gelösten Plasmides, 3 µl NH<sub>4</sub>-Puffer, 0,9 µl MgCl<sub>2</sub>, 1 µl M13 V-Primer (10mM), 1 µl M13 R-Primer (10mM) 0,3 µl dNTP, 0,1 µl Boline-Taq pipettiert. Sie wurde folgendermaßen durchgeführt:

- 1) 95°C für 10 Min. Aufplatzen der Bakterien
- 2) 95°C für 30 Sek. Denaturierung

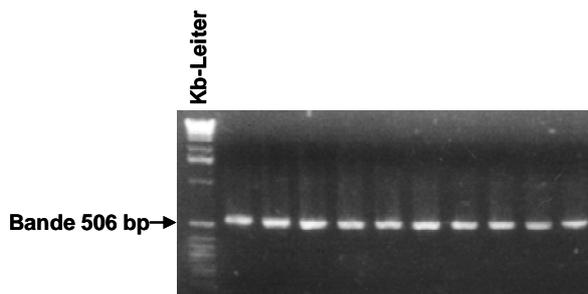
- 3) 55°C für 30 Sek. Annealing
- 4) 72°C für 40 Sek. Elongation
- 5) Schritt 2-4 29x
- 6) 72°C für 10 Min.
- 7) 4°C

Für die PCR wurden die Primer des TOPO TA Cloning Kits verwendet:

M13 F: 5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3'

M13 R: 5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'

Anschließend wurden die PCR-Produkte der Kolonie-PCR oder die Minipräps auf einem 1%igen Agarose-Gel mit einem Größenmarker überprüft. Durch den Einsatz der TOPO-Primer vergrößerte sich die jeweilige Fragmentlänge.



**Abb. 11 Kolonie-PCR;**  
hCpG1.3 kurz amplifiziert mit TOPO-Primern

Die Produkte, die das Insert mit der richtigen Länge enthielten, wurden für die Sequenzierung vorbereitet.

### 3.9 Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde die 1977 von F.Sanger vorgestellte Didesoxy-Methode (=Kettenabbruch-Reaktion) gewählt (Sanger et al. 1977).

#### 3.9.1 Aufreinigung der Proben

Vor der Sequenzierreaktion wurden die Proben enzymatisch aufgereinigt. Dazu wurden 8 µl der Kolonie-PCR mit 3 µl Enzymmix bestehend aus 2,5 µl H<sub>2</sub>O, 0,18 µl Exonuklease 1 (Exo1) und 0,32 µl Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) gemischt und für 35 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte eine 15-minütige Inkubation bei 80°C zur Deaktivierung beider Enzyme. Durch die Exo1/Sap-Methode werden überschüssige Deoxynukleotide und Primer entfernt. Exo 1 verdaut einzelsträngige DNA und damit die

überschüssigen Primer zu dNTPs , SAP baut die Phosphatgruppen der überschüssigen dNTPs ab.

### **3.9.2 Sequenzierreaktion**

Die Sequenzierreaktion erfolgt mit einem käuflichen Kit. Für diese wurden 2 µl des Enzymverdau-Ansatzes mit 1 µl Big Dye, 3 µl 2,5x Puffer, 1 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl Primer (5µM) eingesetzt. Als Sequenzierprimer wurden M13 F und M13R oder die Primer aus der „nested“ PCR eingesetzt.

Sequenzierreaktion:

- 1) 95°C für 1 Minute
- 2) 95°C für 30 Sek Denaturierung
- 3) 55°C für 15 Sek Annealing
- 4) 60°C für 4 Minuten Elongation
- 5) 30x zu 2)
- 6) 60°C für 7 Minuten
- 7) 4°C

### **3.9.3 Ethanolfällung**

Für die Ethanolfällung wurden 2 µl 1,5M Natriumacetat (pH 5,5) und 20 µl 100%iger Ethanol zur Probe gegeben und bei 4°C für 30 Min. bei 14000 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Probe mit 70%igem Ethanol bei 140000 Umdrehungen für 15 Min.gewaschen. Das DNA-Pellett wurde für 3 Min. bei 90°C getrocknet und anschließend bis zur Sequenzierung bei -20°C aufbewahrt.

### **3.9.4 Auswertung der Sequenzierung**

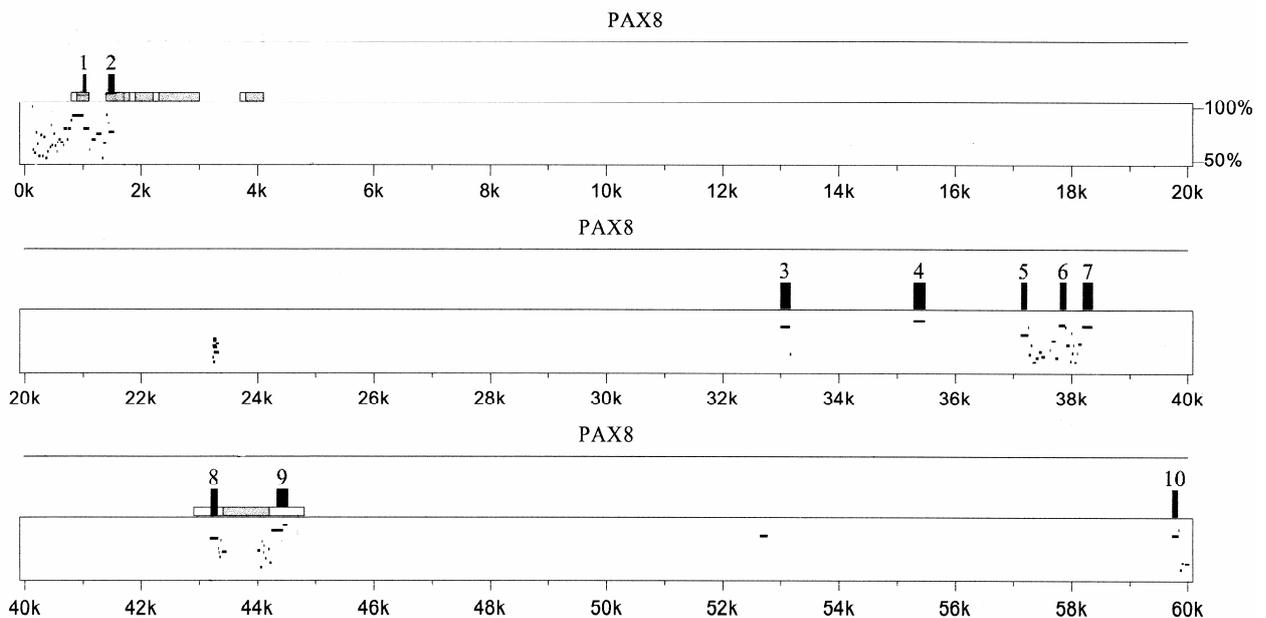
Nach der Sequenzierreaktion wurden die markierten Abbruchprodukte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese an einem Sequenziergerät ABI der Länge nach aufgetrennt. Das Chromatogramm gibt die Sequenz der Basen der sequenzierten Amplikons wieder. Vergleicht man die Sequenzen der Bisulfitumgewandelten DNA mit denen der genomischen DNA so läßt sich eine Aussage darüber treffen, ob ein CpG-Dinukleotid methyliert oder unmethyliert vorliegt. Dies wurde anhand von Graphiken dokumentiert (4.2)

## 4 Ergebnisse

Entsprechend der in Kapitel 2 hergeleiteten Fargestellung werden im Folgenden die Ergebnisse zur Analyse der CpG-Methylierung im *PAX8*-Gen dargestellt.

### 4.1 CpG-Inseln im Bereich des *PAX8/Pax8* bei Mensch und Maus

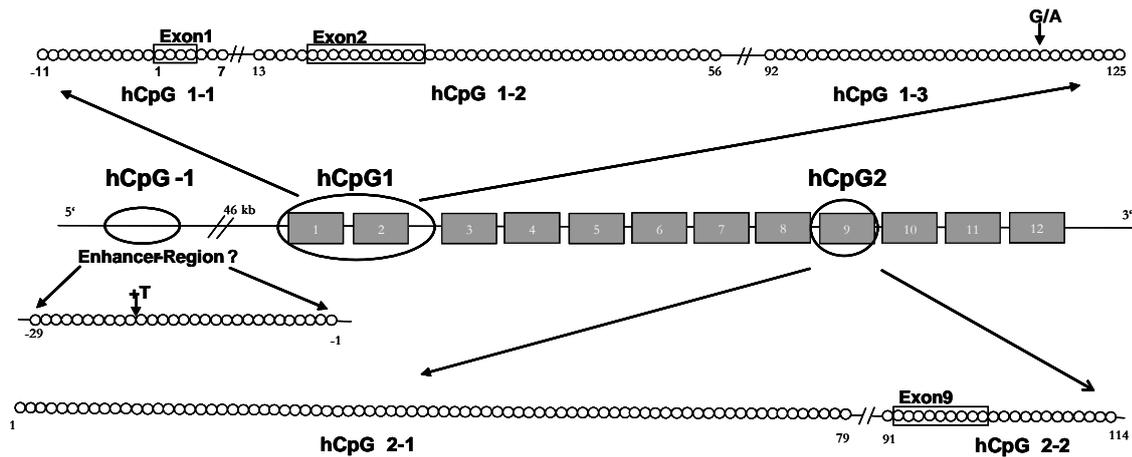
CpG-Inseln in der zu untersuchenden Sequenz wurden mittels PipMaker-Software identifiziert (Schwartz et al. 2000) (Abb. 12).



**Abb. 12 PipMaker-Analyse des *Pax8*.**

Die erhöhte CpG-Dichte zeigt sich anhand der grauen Kästchen in der Region Exon1/2 sowie im Intron 8; Die waagerechten Balken (schwarz) zeigen eine Sequenzhomologie zwischen Mensch und Maus

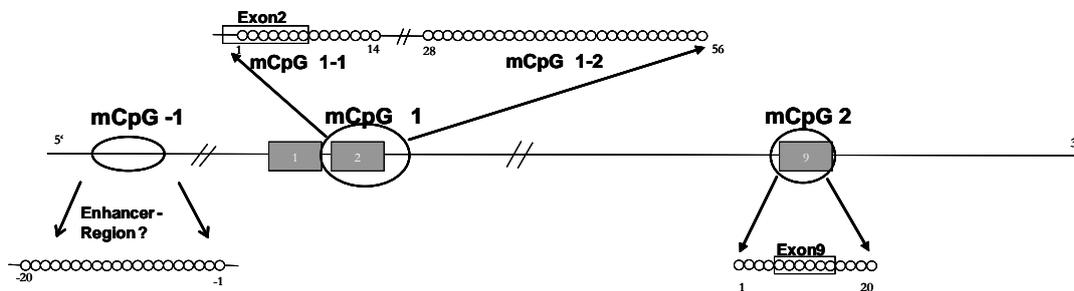
Dabei zeigten sich beim humanen *PAX8*-Gen zwei CpG-Inseln. Die erste Insel (**hCpG1**) beginnt kurz vor dem Exon 2 und reicht bis in das Intron 2. Eine erhöhte CpG-Dinukleotid-Dichte in einem kurzen Sequenzbereich konnte ebenfalls vor dem Exon 1 identifiziert werden, so dass dieser Bereich beim Menschen aufgrund seiner funktionellen Relevanz für den Transkriptionsstart mit in die Analyse einbezogen wurde (hCpG1.1). Die zweite mittels PipMaker-Software identifizierte CpG-Insel befindet sich im Intron 8 (**hCpG2**). Aus technischen Gründen wurde die hCpG1 in die Fragmente hCp1.1, hCpG1.2 und hCpG1.3 unterteilt, die hCpG2 in die Fragmente hCpG2.1 und hCpG2.2 (Abb. 13).



**Abb. 13 Nomenklatur der untersuchten Fragmente (Mensch).**

Darstellung der Fragmente mit entsprechender CpG-Anzahl (Kreis).SNPs (schwarzer Pfeil) in hCpG-1 und hCpG1.3

Bei der Maus fand sich eine CpG-Insel (**mCpG1**) analog zur hCpG1 beginnend vor dem Exon 2 bis in das Intron 2 reichend (Abb. 14). Die Region analog zur hCpG2 (**mCpG2**) weist bei der Maus eine deutlich geringere CpG-Dichte auf, da hCpG2 auf ein 14 Basenpaar langes Wiederholungsmotiv in der Sequenz zurückzuführen ist, das bei der Maus nur in einfacher Form vorliegt.

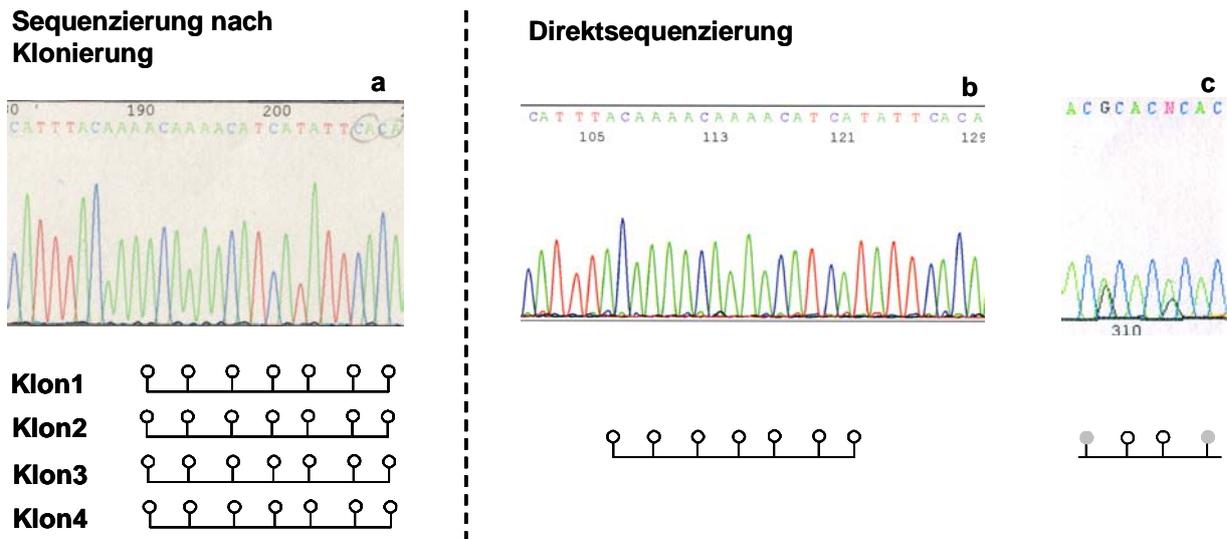


**Abb. 14 Nomenklatur der untersuchten Fragmente (Maus).**

Darstellung der Fragmente mit entsprechender CpG-Anzahl (Kreis).

Der Promotor-Bereich des *Pax8*-Gens ist bislang nicht bekannt. Unpublizierte Daten aus der Arbeitsgruppe über Homologien des putativen Promotorbereiches und Enhancer-Regionen im 5'-Bereich von *Pax8* verschiedener Spezies zeigten eine weitere CpG-Insel beim Menschen, die 46 kb 5' vom Exon 1 des *PAX8* entfernt liegt (hCpG minus 1= **hCpG-1**) (Abb. 13). Diese Region ist in der Nukleotidsequenz bei der Maus hochgradig konserviert (**mCpG-1**)(Abb. 14).

## 4.2 Auswertung der Sequenzen



**Abb. 15 Sequenzvergleich einer PCR Bisulfitemgewandelter DNA**

(Rückwärtssequenz) a) Sequenz eines Klons b) Direktsequenzierung= Sequenz der Summe aller PCR-Produkte, homogen c) Direktsequenzierung, heterogen

Für die Auswertung der Sequenzen dienten Grafiken, in denen jedes CpG-Dinukleotid des jeweiligen Fragments durch einen Kreis symbolisiert wurde (Abb. 15). Dabei wurde in der Auswertung der Klone ein nicht methyliertes CpG-Dinukleotid mit einem weißen Kreis und ein methyliertes mit einem schwarzen Kreis dargestellt. Jede horizontale Linie entspricht einem Klon mit der entsprechenden Anzahl an CpGs.

In den Auswertungen der Direktsequenzen wurde ein weißer Kreis zur Darstellung der nicht methylierten CpG-Dinukleotide, ein schwarzer Kreis für die methylierten CpG-Dinukleotide und ein grauer Kreis für CpG-Dinukleotide, die teils methyliert teils unmethyliert vorlagen, gewählt. Hier stellt die horizontale Linie jeweils eine Direktsequenzierung dar. Konnten einzelne CpGs in den Sequenzen nicht ausgewertet werden, so erscheinen sie in der Graphik grau umrandet. Die Höhe der heterogenen Peaks in der Sequenz bei gleichzeitigem Vorliegen von methylierten und unmethylierten CpGs lassen keine quantitativen Rückschlüsse zu (Abb. 15).

Als interne Kontrolle, ob beide Ausgangs-Allele des *PAX8*-Gens gleichwertig nach der Bisulfit-PCR-Sequenzierungs-Versuchsreihe repräsentiert sind, dienten Personen, bei denen SNPs heterozygot vorlagen. In den Graphiken sind diese SNPs durch Pfeile an der entsprechenden Position gekennzeichnet (schwarzer Pfeil entspricht einem homozygoten SNP in der Direktsequenzierung oder das Vorhandensein in einem

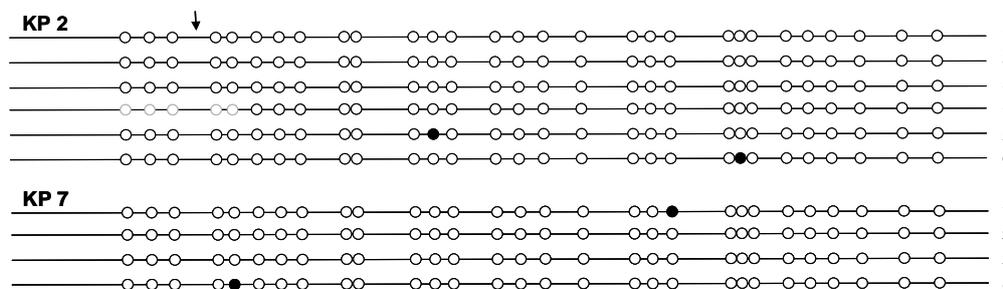
einzelnen Klon, grauer Pfeil entspricht einem heterozygoten SNP in der Direktsequenzierung). In allen untersuchten Bisulfitsequenzen waren diese entsprechend der genomischen Sequenz heterozygot oder homozygot repräsentiert.

### 4.3 DNA- Methylierungsmuster humaner LZ-DNA und im Gewebevergleich

Um zu erfassen, ob für die gewählten Fragmente in der Region des *PAX8*-Gens bestimmte Methylierungsmuster existieren und ob diese interindividuellen Schwankungen unterliegen, wurden periphere Blutleukozyten (LZ) verschiedener gesunder adulter Probanden analysiert. Im Anschluß wurde die Methylierung verschiedener Gewebearten des gleichen Individuums wie LZ, Schilddrüse (SD) und Wangenschleimhaut (WSH) untersucht, um gewebespezifische Unterschiede des Methylierungsmusters erfassen zu können. Untersucht wurden die Fragmente hCpG-1, hCpG1.1, hCpG1.2, hCpG1.3 und hCpG2.2.

#### 4.3.1 Ergebnisse hCpG-1

Dieser 5' gelegene Bereich im putativen Enhancer-Bereich des *PAX8*-Gens stellte sich in LZ-DNA als nicht methyliert dar. Ausgewertet wurden Sequenzen von 10 Klonen zweier verschiedenener Individuen. Es zeigte sich eine Methylierung von **1%** (174 CpGs aus 6 Klonen) und von **2%** (116 CpGs aus 4 Klonen)(Abb. 16).

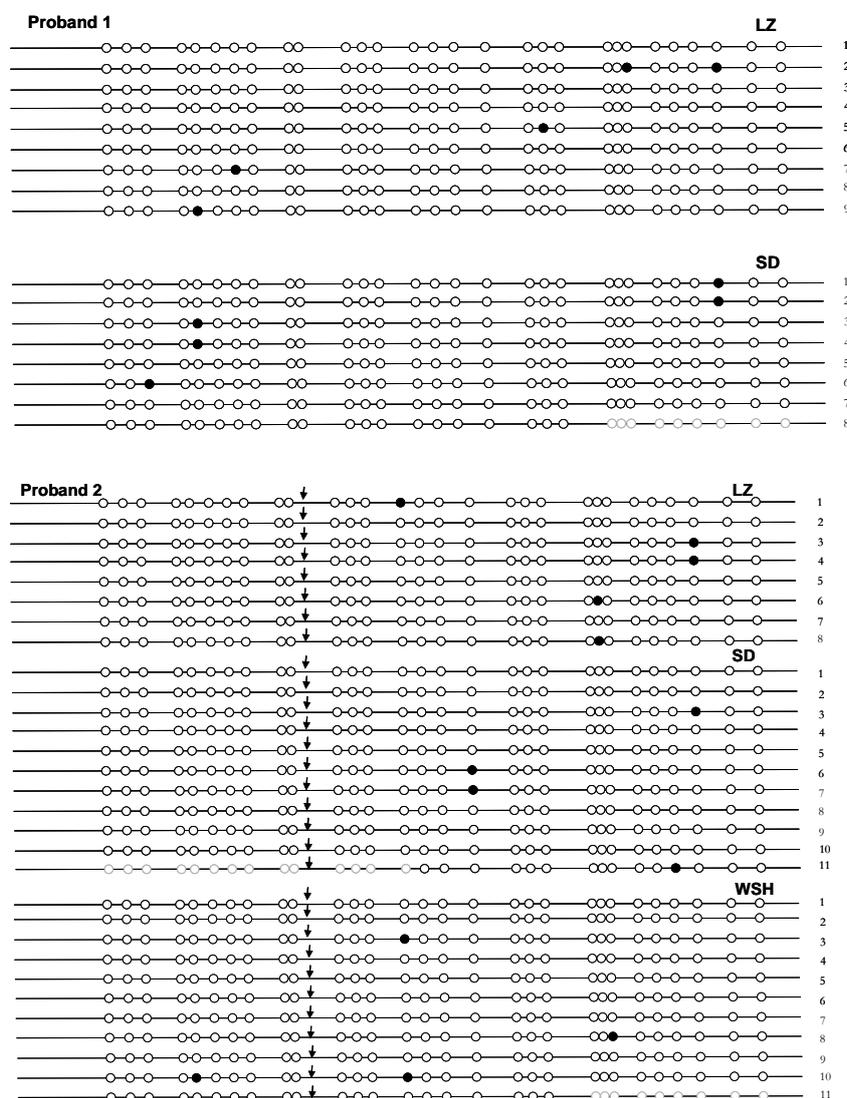


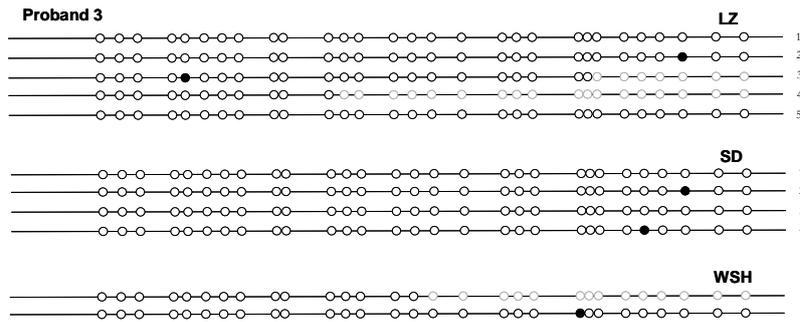
**Abb. 16 hCpG-1/LZ.**

Ergebnisse der Sequenzierung nach Klonierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus Kontroll-Leukozyten-EDTA

Zusätzlich wurde die Methylierung des Fragments hCpG-1 bei 4 verschiedenen Probanden im Gewebevergleich untersucht. Dabei zeigte sich bei allen untersuchten Proben eine niedrige Methylierung (Abb. 17, Abb. 18). Beim ersten Proband (Proband 1) wurde die Methylierung von LZ und SD miteinander verglichen (Abb. 17). Dies ergab bei beiden eine Methylierung von **2%** (261 CpGs aus 9 Klonen LZ-DNA) (232 CpGs aus 8 Klonen SD-DNA). Bei weiteren 2 Probanden (P2 und P3) wurden die Sequenzen von

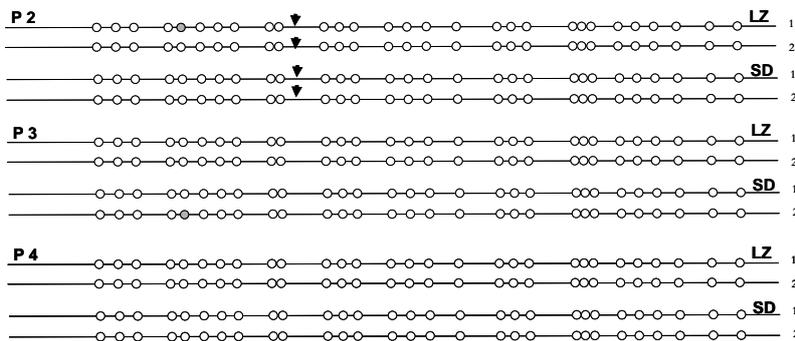
LZ, SD und WSH nach Einklonierung miteinander verglichen. Dabei zeigte sich bei P2 eine Methylierung von **2 %** (232 CpGs aus 8 Klonen) in den LZ und von je **1 %** in SD und WSH (je 319 CpGs aus 12 Klonen). Bei P3 zeigte sich eine Methylierung von **1%** (145 CpGs aus 5 Klonen) in den LZ, von **2%** (116 CpGs aus 4 Klonen) in der SD und von **2%** (58 CpGs aus 2 Klonen) in der WSH. Diese niedrige Methylierung von LZ und SD bestätigte sich in zwei weiteren mittels Direktsequenzierung ausgewerteten Versuchen der gleichen Probanden P2 und P3 (Abb. 18). Der vierte Proband (P4) zeigte keine Methylierung in der Direktsequenzierung von LZ-DNA und SD-DNA in zwei Versuchen.





**Abb. 17 hCpG-1/Gewebevergleich.**

Ergebnisse der Sequenzierung nach Klonierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ,SD und WSH



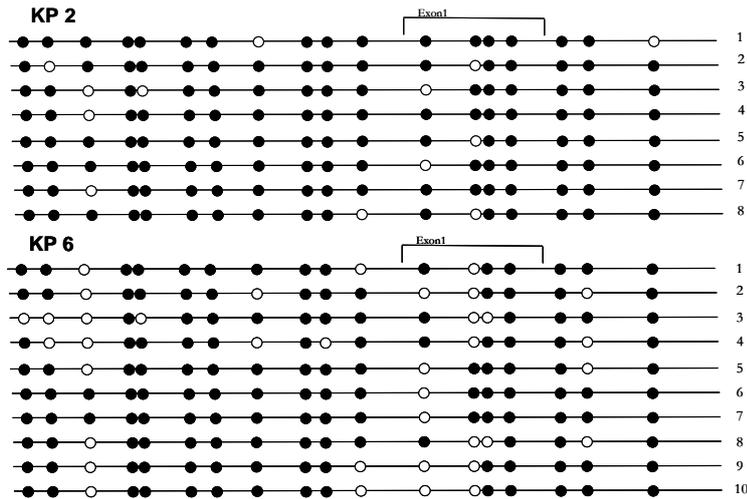
**Abb. 18 hCpG-1/Gewebevergleich.**

Ergebnisse der Direktsequenzierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ und SD.

Zusammenfassend konnte für das Fragment hCpG-1 ein gewebeunabhängiges, durchgehend hypomethyliertes Muster gefunden werden.

#### 4.3.2 Ergebnisse hCpG1.1.

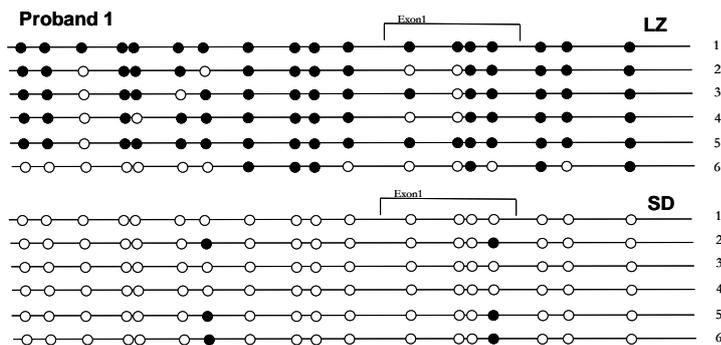
Dieses unmittelbar um den Transkriptionsstart von *PAX8* liegende Fragment stellte sich in humaner LZ-DNA stark methyliert dar. Ausgewertet wurden 18 Sequenzen nach Einklonierung der PCR von zwei verschiedenen Individuen (Abb. 19). Dabei zeigte sich eine Methylierung von **91 %** (144 CpGs aus 8 Klonen) (KP2) und eine Methylierung von **79%** (180 CpGs aus 10 Klonen)(KP7).

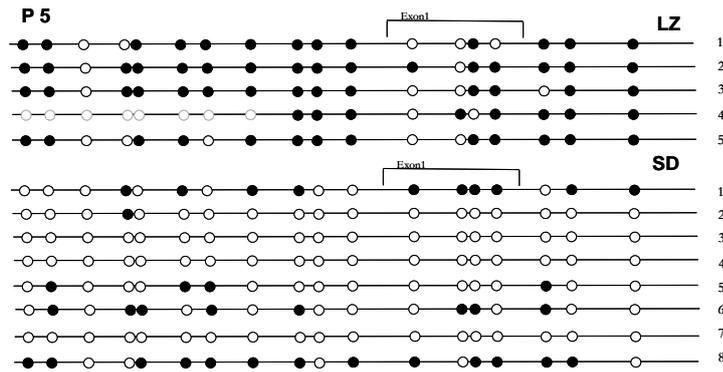


**Abb. 19 hCpG1.1/LZ.**

Ergebnisse der Sequenzierung nach Klonierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ

Im Gewebevergleich wurden LZ- und SD-DNA von 5 weiteren Probanden untersucht. Bei zwei Probanden wurde die PCR der Bisulfit-umgewandelten DNA einkloniert und sequenziert. Dabei zeigte sich bei beiden ein deutlicher Unterschied in der Methylierung zwischen Blutleukozyten und Schilddrüse (Abb. 20). Der erste Proband (Proband 1) zeigte eine Methylierung von **78%** in den LZ und von **6%** in der SD (je 108 ausgewerteten CpGs aus 6 Klonen). Beim zweiten Proband (P 5) ergab sich eine Methylierung von **71%** in den LZ (90 CpGs aus 5 Klonen) und **25%** in der SD (144 CpGs aus 8 Klonen).

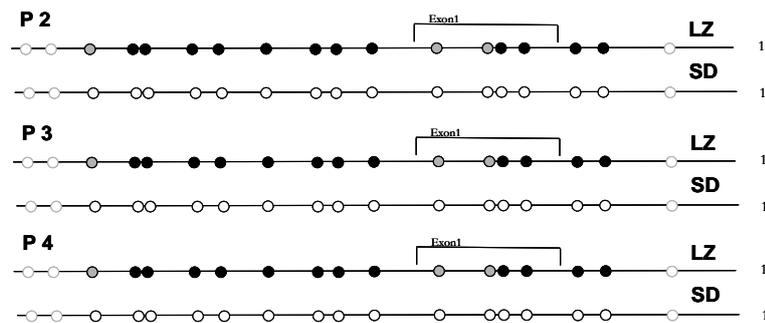




**Abb. 20 hCpG1.1/Gewebevergleich**

Ergebnisse der Sequenzierung nach Klonierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ und SD

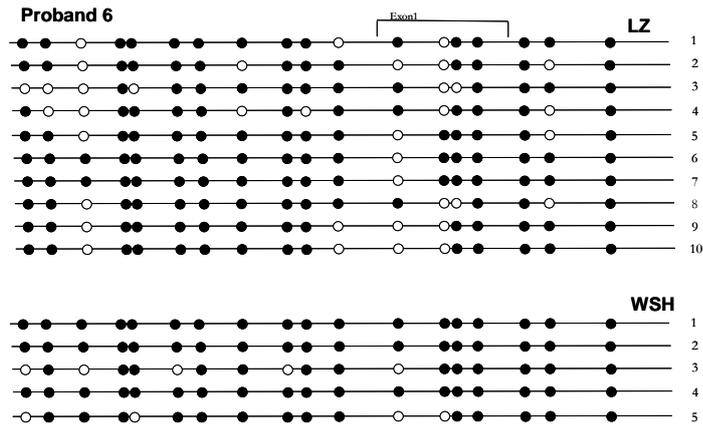
Dieser deutliche Unterschied zwischen hoher Methylierung von LZ-DNA und niedriger Methylierung von SD-DNA fand sich auch bei allen drei mittels Direktsequenzierung ausgewerteten Probanden P2, P3 und P4 (Abb. 21).



**Abb. 21 hCpG1.1/Gewebevergleich.**

Ergebnisse der Direktsequenzierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ und SD

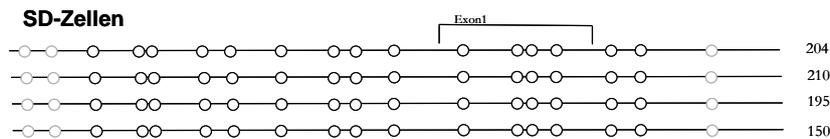
Bei einem weiteren Probanden (Proband 6) wurde die Methylierung von LZ- und WSH-DNA miteinander verglichen. Dabei zeigte sich eine vergleichbar hohe Methylierung von **79%** in den LZ (180 CpGs aus 10 Klonen) gegenüber **90%** in der WSH (90 CpGs aus 5 Klonen) (Abb. 22).



**Abb. 22 hCpG1.1/Gewebevergleich**

Ergebnisse der Sequenzierung nach Klonierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ und WSH.

Aufgrund des sich gegenüber LZ- und WSH-DNA abgrenzenden hypomethylierten Musters der SD-DNA wurden postoperative DNA-Proben von weiteren 4 Schilddrüsen mit verschiedenen Pathologien (Struma nodosa, M. Basedow) in die Methylierungsanalyse miteinbezogen. Auch diese stellten sich in der Direktsequenzierung als nicht methyliert dar (Abb. 23).

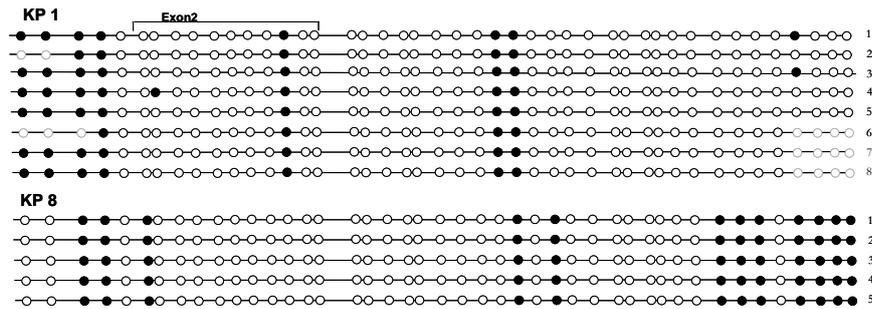


**Abb. 23 hCpG1.1/SD-Zellen**

Ergebnisse Direktsequenzierung von SD-Material.

### 4.3.3 Ergebnisse hCpG1.2

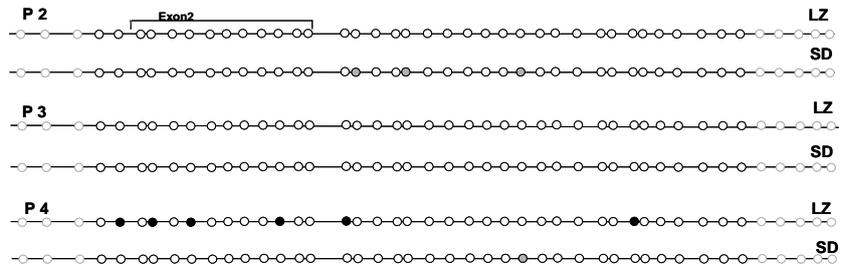
Das Fragment hCpG1.2 stellte sich deutlich weniger methyliert dar als der weiter 5' gelegene Bereich hCpG1.1. Ausgewertet wurden 13 Sequenzen nach Einklonierung von zwei verschiedenen Individuen (Abb. 24). Dabei zeigte sich bei der ersten Person (KP1) eine Methylierung von **16%** (335 CpGs aus 8 Klonen), bei der zweiten (KP8) eine Methylierung von **27%** (220 CpGs aus 5 Klonen).



**Abb. 24 hCpG1.2/LZ**

Ergebnisse der Sequenzierung nach Klonierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ

Im Gewebevergleich wurden die Direktsequenzen von LZ- und SD-DNA von 3 weiteren Probanden miteinander verglichen. Hierbei stellten sich die Sequenzen gering methyliert dar mit keinen signifikanten Unterschieden (Abb. 25). Lediglich bei P4 scheint noch eine leicht erhöhte Methylierung von LZ-DNA gegenüber SD-DNA zu bestehen.

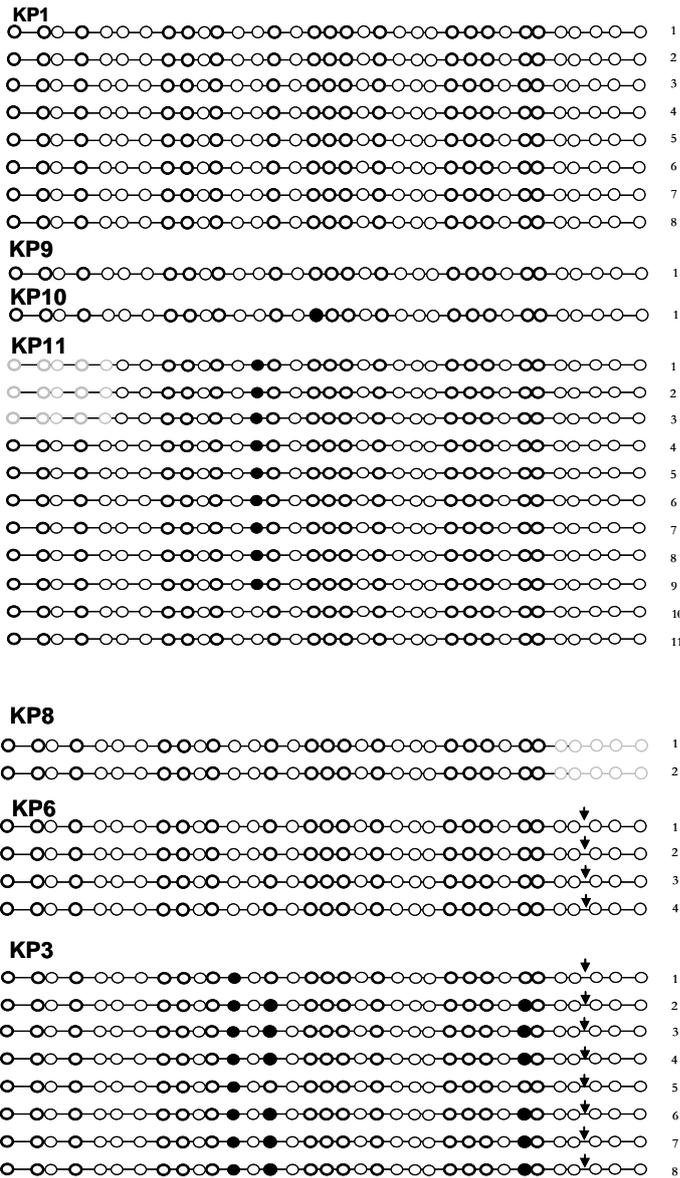


**Abb. 25 hCpG1.2/Gewebevergleich**

Ergebnisse der Direktsequenzierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ und SD

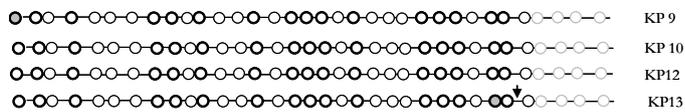
#### 4.3.4 Ergebnisse hCpG1.3

Das 3' gelegene Fragment der hCpG1-Insel stellte sich in den Kontroll-Leukozyten als nicht methylierter Bereich dar. Analysiert wurden 35 Klone von 7 verschiedenen Individuen sowie Direktsequenzen von 4 weiteren Personen (Abb. 26, Abb. 27). Dabei zeigte sich in der Auswertung der Klone eine Methylierung von **0%** (272 CpGs aus 8 Klonen) (KP1), **0%** (34 CpGs aus 1 Klon)(KP9), **3%** (34 CpGs aus 1 Klon) (KP10), **3%** (374 CpGs aus 11 Klonen)( KP11), **0%** (58 CpGs aus 2 Klonen) (KP8), **0%** (136 CpGs aus 4 Klonen) (KP6) und **7%** (272 aus 8 Klonen) (KP3).



**Abb. 26 hCpG1.3/LZ.**

Ergebnisse der Sequenzierung nach Klonierung von Bisulfit-umgewandelter LZ-DNA

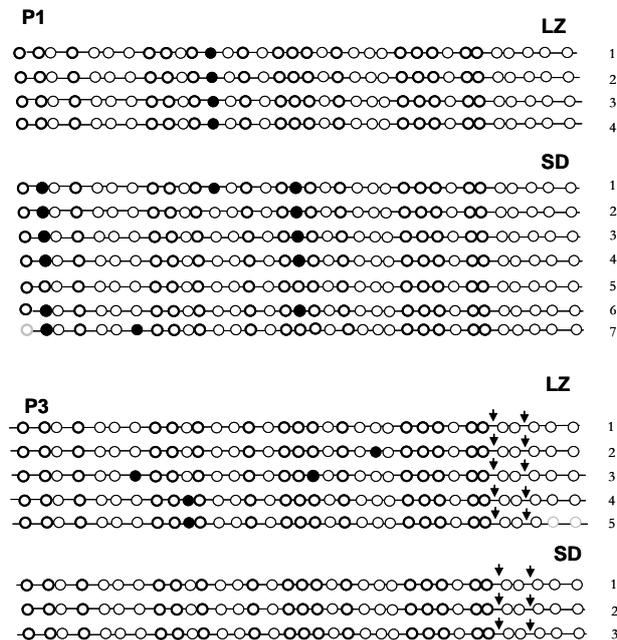


**Abb. 27 hCpG1.3/LZ.**

Ergebnisse der Direktsequenzierung von Bisulfit-umgewandelter LZ-DNA

Dieser Bereich stellte sich auch in allen untersuchten Gewebeproben überwiegend nicht methyliert dar. Untersucht wurden im Gewebevergleich vier Probanden, davon erfolgte bei zweien die Auswertung der Sequenzen nach Einklonierung (Abb. 28). Proband 1 (P1) zeigte in der LZ-DNA eine Methylierung von **3%** (136 CpGs aus 4 Klonen), in der SD-DNA eine Methylierung von **5%** (237 CpGs aus 7 Klonen). Der zweite Proband (P3)

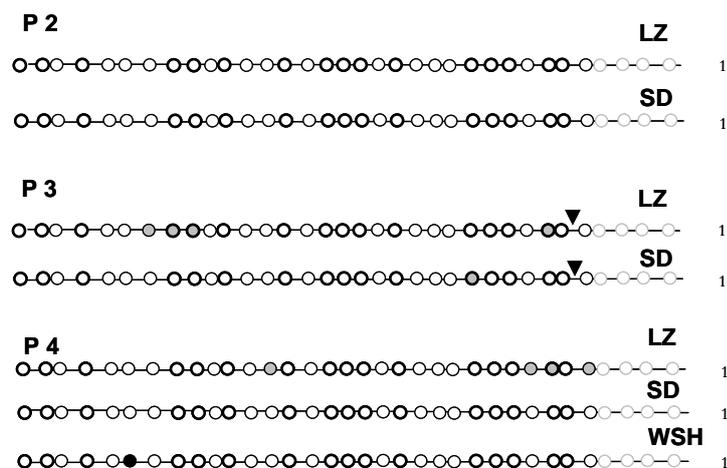
zeigte eine Methylierung von **3%** in der LZ-DNA (168 CpGs aus 5 Klonen) und **0%** in der SD-DNA (102 CpGs aus 3 Klonen).



**Abb. 28 hCpG1.3/Gewebevergleich**

Ergebnisse der Sequenzierung nach Klonierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ und SD

Die Ergebnisse von P3 ließen sich in einem weiteren Versuch ausgewertet mittels Direktsequenzierung bestätigen (Abb. 29). Die Versuche der beiden weiteren Probanden (P2 und P4) wurden ebenfalls mittels Direktsequenzierung ausgewertet. Dabei zeigte sich auch hier in der LZ- und SD-DNA von P2 sowie in der LZ-, SD- und WSH-DNA von P4 eine sehr niedrige Methylierung (Abb. 29)



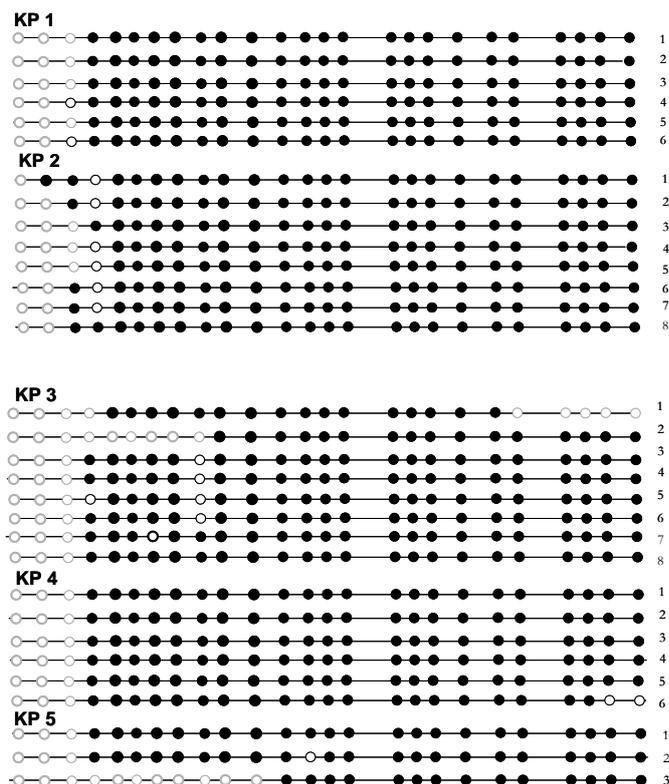
**Abb. 29 hCpG1.3/Gewebevergleich/DS**

Ergebnisse der Direktsequenzierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ, SD und WSH

### 4.3.5 Ergebnisse hCpG2

Die hCpG-Insel 2 wurde zunächst zur PCR-Amplifizierung in die Fragmente hCpG2.1 und hCpG2.2 unterteilt. Für das Fragment hCpG2.1 konnten keine auswertbaren Sequenzen gewonnen werden. Es handelt sich um ein mit 809 bp sehr langes Fragment, das überwiegend aus einem Motiv von 44 Basenpaaren besteht, das sich nahezu identisch 14 mal wiederholt. Durch das Wiederholungsmotiv war es nicht möglich, das Fragment zu verkleinern bzw. Primer für die Sequenzierung in diesen Bereich zu legen, da dies zu einer multiplen Bindung der Primer geführt hätte.

Der 3'-Bereich dieser Insel (hCpG 2.2) stellte sich in der Sequenzierung nach Einklonierung stark methyliert dar (Abb. 30). Ausgewertet wurden die Sequenzen von 31 Klonen 5 verschiedener Individuen. Dabei zeigten sich hohe Methylierungsraten von **99%** (134 CpGs aus 6 Klonen)(KP1), **97%** (182 CpGs aus 8 Klonen) (KP2), **96%** (164 CpGs aus 8 Klonen)(KP3), **98%** (132 CpGs aus 6 Klonen) (KP 4) und **98%** (58 CpGs aus 3 Klonen) (KP 5).

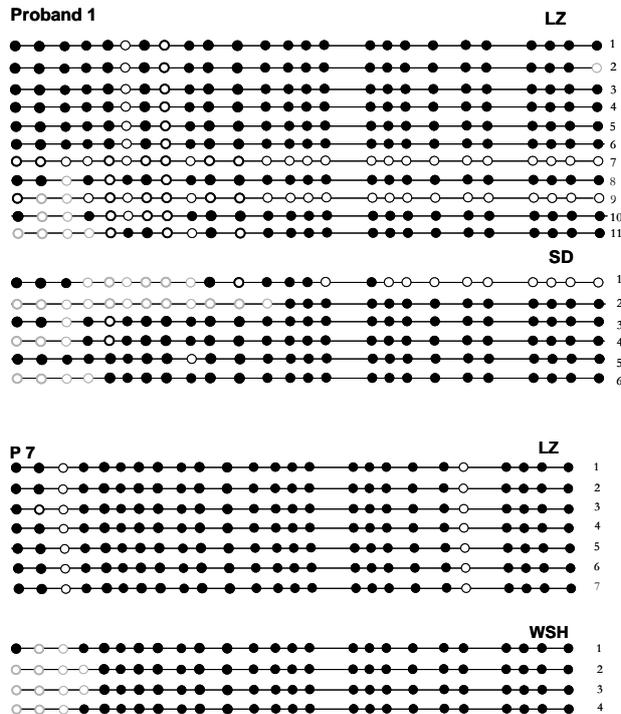


**Abb. 30 hCpG2.2/LZ.**

Ergebnisse der Sequenzierung nach Klonierung von Bisulfit-umgewandelter Leukozyten-DNA

Ebenso im Gewebevergleich stellte sich dieser Bereich bei zwei untersuchten Probanden in allen Sequenzen stark methyliert dar (Abb. 31). Verglichen wurde beim

ersten Proband (P1) LZ- und SD-DNA, beim zweiten Proband (P7) LZ- und WSH-DNA. Dabei zeigte sich bei P1 in den LZ eine Methylierung von **74%** (265 CpGs aus 11 Klonen) und von **89%** (124 CpGs aus 6 Klonen) in der SD, bei P7 eine Methylierung von **91%** (175 CpGs aus 7 Klonen) in den LZ und von **94 %** (93 CpGs aus 4 Klonen) in der WSH.

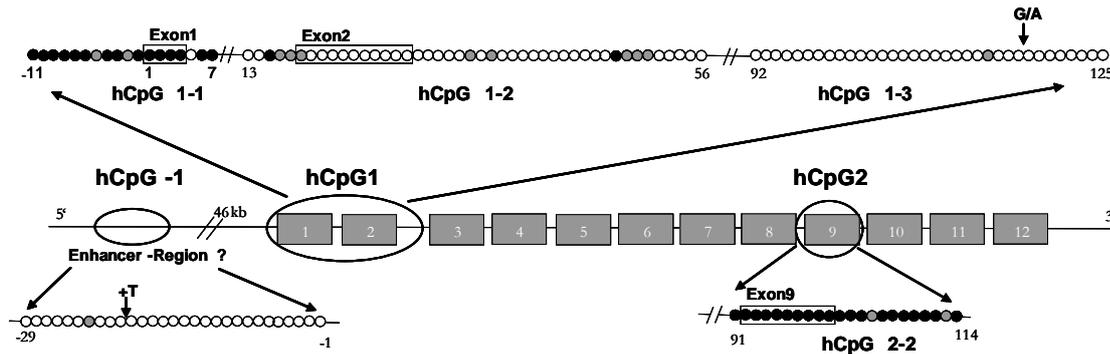


**Abb. 31 hCpG2.2/Gewebevergleich**

Ergebnisse der Sequenzierung nach Klonierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ, SD und WSH

#### 4.3.6 Zusammenfassung der Methylierung in Leukozyten-DNA

Es konnte anhand von Leukozyten-DNA verschiedener Kontrollpersonen gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Fragmente typische Methylierungsmuster aufweisen (Abb. 32). Dabei ergaben sich keine interindividuellen Abweichungen.



**Abb. 32 Überblick Methylierungsmuster PAX8 (Bsp.)**

hCpG-1 nicht methyliert; hCpG1 im 5'-Bereich stark methyliert (hCpG1.1), im mittleren Bereich (hCpG1.2) geringfügig methyliert, im 3'-Bereich nicht methyliert (hCpG1.3); hCpG 2.2 stark methyliert

#### 4.3.7 Zusammenfassung der Methylierung im Gewebevergleich

In den untersuchten Fragmenten hCpG-1, hCpG1.2, hCpG1.3 sowie hCpG2.2 ließen sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Geweben in der DNA-Methylierung nachweisen. Hier bestätigte sich für alle Fragmente das Methylierungsmuster der Leukozyten-DNA.

In dem Fragment hCpG1.1 zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Methylierung von SD-DNA gegenüber Leukozyten- und WSH-DNA. Hierbei zeigten Leukozyten- und WSH-DNA eine auch unter 4.1.2 beschriebene hohe Methylierung zwischen **71** und **90** %, wohingegen die SD-DNA eine Methylierung zwischen **0** und **25** % aufwies.

#### 4.4 Ergebnisse der DNA- Methylierung bei der Maus

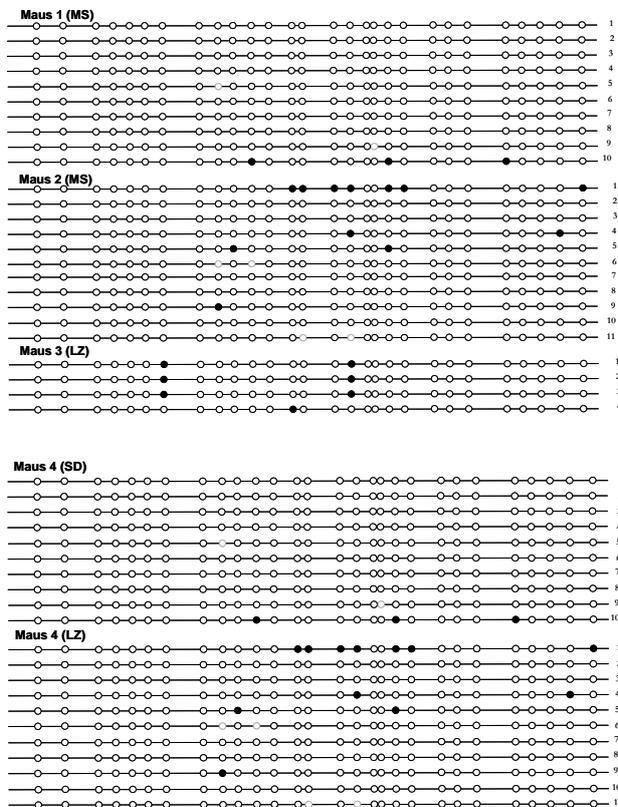
Bei der Maus wurde die Methylierung der Fragmente mCpG-1, mCpG1.1, mCpG1.2 sowie mCpG2 untersucht. Eine konservierte Position der CpG-Dinukleotide sowie ein konserviertes DNA-Methylierungsmuster könnte eine Funktionsrelevanz in diesem Bereich anzeigen. Als Ausgangsmaterial dienten periphere Leukozyten extrahiert aus EDTA-Vollblut (LZ), Schilddrüsengewebe (SD) sowie Mausschwanz (MS).

##### 4.4.1 Ergebnisse mCpG -1

Bei der Wildtyp-Maus (WT) zeigte sich die mCpG-1 in 6 Klonen bei 3 verschiedenen Tieren nicht methyliert (Abb. 33). Dieses Muster entspricht der homologen und stark konservierten Region hCpG-1 beim Menschen.

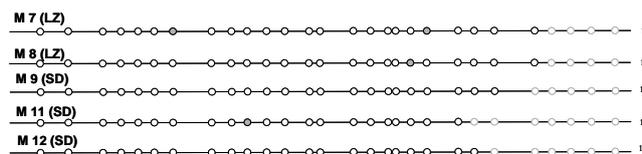


Diese niedrige Methylierung zeigte sich auch in Versuchen von LZ- und SD-DNA extrahiert aus 5 weiteren WT-Mäusen nach Auswerten der Direktsequenzierung (Abb. 36).



#### Abb. 35 mCpG1.2/Maus/Klonierung

Ergebnisse der Sequenzierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus MS, LZ und SD nach Klonierung

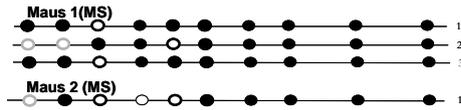


#### Abb. 36 mCpG1.2/Maus/DS

Ergebnisse der Direktsequenzierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ und SD

#### 4.4.4 Ergebnisse mCpG2

Das Fragment mCpG 2 entspricht der hCpG2.2, da der 5'-Bereich der humanen CpG2-Insel bei der Maus nicht vorhanden ist. 4 ausgewertete Klone von 2 verschiedenen Tieren zeigten eine hohe Methylierung vergleichbar der hCpG2.2 (Abb. 37).



**Abb. 37mCpG2/Maus/Klonierung**

Ergebnisse der Sequenzierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus Mäuseschwanz

#### 4.4.5 Zusammenfassung der DNA-Methylierung bei der Maus

Beim Vergleich der humanen Sequenzen und der Maus-Sequenzen im Bereich des *Pax8* zeigten sich die Regionen hCpG-1/mCpG-1 und hCpG1 in der Sequenz hoch konserviert. Der Bereich mCpG-1 stellte sich entsprechend der humanen hCpG-1 hypomethyliert dar. Der Bereich mCpG1.1 zeigte ebenfalls organspezifische Methylierungsmuster vergleichbar mit denen der humanen hCpG1.1 mit deutlich hypermethylierten Mustern in Herz und Blutleukozyten gegenüber einem hypomethylierten Muster in der Schilddrüse.

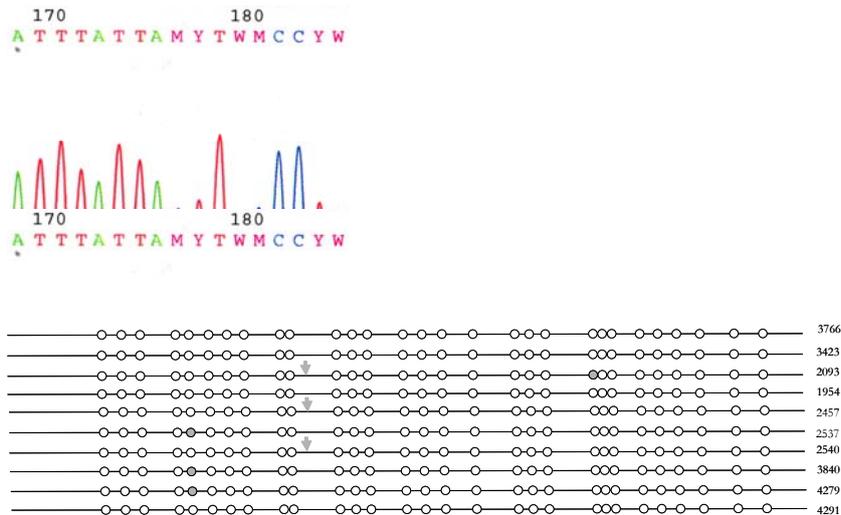
### 4.5 Ergebnisse der Methylierungsanalyse bei Patienten mit Schilddrüsenfehlbildungen

Bei den Patienten mit Schilddrüsenfehlbildungen wurden die Fragmente hCpG-1, hCpG1.1, hCpG1.2 sowie hCpG1.3 in LZ-DNA untersucht mit der Fragestellung, ob sich Unterschiede in der Methylierung gegenüber den Probanden darstellen ließen. Liegt ein Bereich normalerweise hypomethyliert vor, dann könnte eine pathologische Hypermethylierung einen Funktionsverlust verursachen.

#### 4.5.1 Ergebnisse hCpG -1

Die Methylierung des Fragmentes hCpG-1 wurde bei insgesamt 12 Patienten untersucht. Dieses Fragment stellte sich entsprechend dem Wildtyp bei allen untersuchten Proben kaum methyliert dar (Abb. 39, Abb. 38).

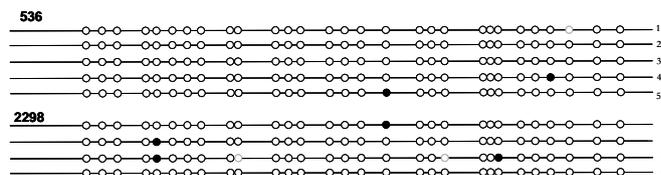
Zehn Patienten wurden mittels Direktsequenzierung ausgewertet und zeigten keine methylierten CpG-Dinukleotide (Abb. 38). Von drei der untersuchten Patienten war aus der genomischen Analyse ein heterozygoter +T-SNP bekannt, der sich nach Bisulfitbehandlung in der Direktsequenzierung mit einem frameshift gut darstellen ließ (Abb. 38).



### Abb. 38 hCpG-1/CH/SNP und DS

Darstellung des heterozygoten +T-SNP in der Rückwärts-Sequenz;  
Ergebnisse der Direktsequenzierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ von 10 CH-Patienten

Bei zwei Patienten wurde das PCR-Produkt nach der Bisulfitbehandlung einkloniert (Abb. 39). In der Auswertung zeigte sich eine Methylierung von **1%** (145 CpGs aus 5 Klonen) (536) und **3%** (116 CpGs aus 4 Klonen) (2298).

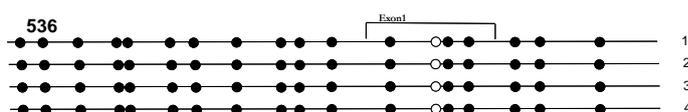


### Abb. 39 hCpG-1/CH/Klonierung

Ergebnisse der Sequenzierung nach Klonierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ von 2 CH-Patienten

## 4.5.2 Ergebnisse hCpG 1.1

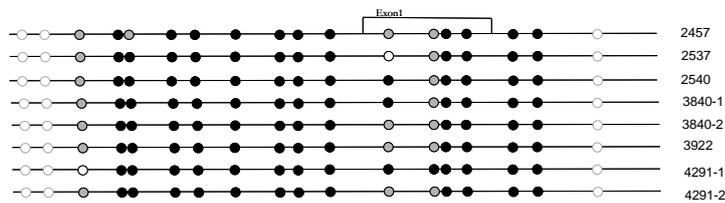
Die Methylierung des Fragments hCpG1.1 wurde bei 7 Patienten untersucht. Dabei zeigte sich in allen Auswertungen ein mit dem Wildtyp vergleichbar stark methyliertes Muster. Der erste Patient (536) wies nach Einklonierung eine Methylierung von **94%** auf (72 CpGs aus 4 Klonen)(Abb. 40).



### Abb. 40 hCpG1.1/CH/Klonierung

Ergebnisse der Sequenzierung nach Klonierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ von 4 CH-Patienten

Alle anderen Daten wurden mittels Direktsequenzierung aus ein bis zwei Versuchen ermittelt (Abb. 41).

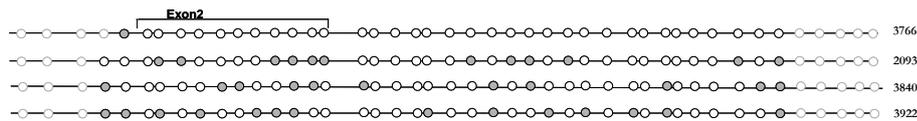


**Abb. 41 hCpG1.1/CH/DS**

Ergebnisse der Direktsequenzierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ von CH-Patienten

#### 4.5.3 Ergebnisse hCpG 1.2

Die hCpG1.2 stellt in der Wildtypmethylierung einen Übergang zwischen dem stark methyliertem 5'-Bereich und dem kaum methylierten 3'-Bereich mit einer deutlichen Tendenz zu geringer Methylierung dar. Dies spiegelte sich in allen mittels Direktsequenzierung ausgewerteten vier Patientenproben wieder (Abb. 42).

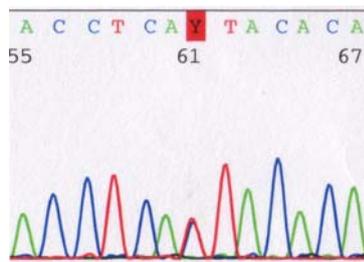


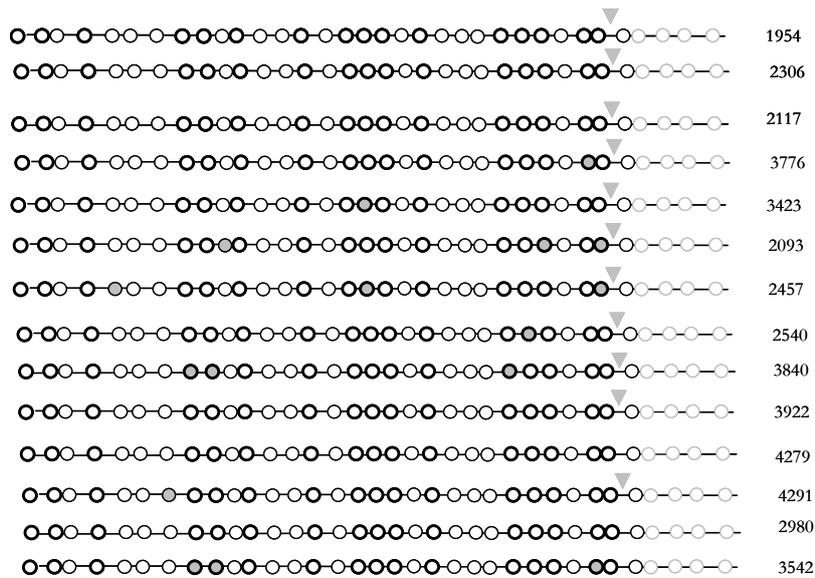
**Abb. 42 hCpG1.2/CH/DS**

Ergebnisse der Direktsequenzierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ von 4 Patienten mit CH

#### 4.5.4 Ergebnisse hCpG-Insel 1.3

Dieses Fragment, das sich in der DNA-Methylierung der Kontrollpersonen als kaum methyliert darstellt, wurde bei 19 Patienten mit Schilddrüsenfehlbildungen untersucht. Bei 14 Patienten erfolgte die Auswertung mittels Direktsequenzierung der Bisulfit-umgewandelten DNA. Diese waren in ihrem Methylierungsmuster unauffällig (Abb. 43). 11 dieser Patienten wiesen in der genomischen Sequenz einen heterozygoten G zu A-SNP auf, der sich in der Sequenz der Bisulfit-umgewandelten DNA gut darstellen ließ (Abb. 43)





### Abb. 43 hCpG1.3/CH/SNP und DS

Darstellung des heterozygoten G zu A-SNP in der Rückwärts-Sequenz;

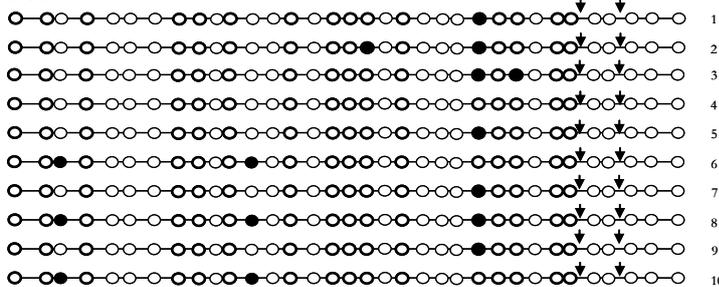
Ergebnisse der Direktsequenzierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ von 14 CH-Patienten

Bei 5 der CH-Patienten wurde die PCR der Bisulfitumgewandelten DNA einkloniert. Dabei zeigten die Sequenzen von drei Patienten unauffällige Ergebnisse mit einer Methylierung von **3%** (68 CpGs aus 2 Klonen), **4%** (340 CpGs aus 10 Klonen) und **1%** (340 CpGs aus 10 Klonen) (Abb. 44).

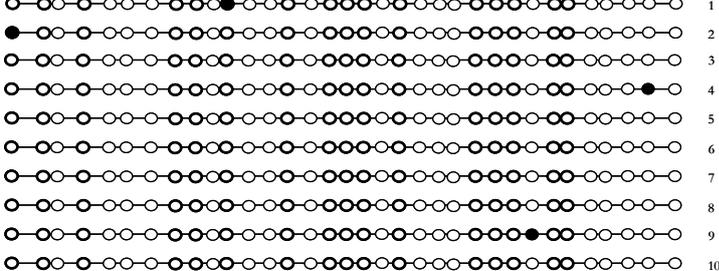
### 1628



### 345



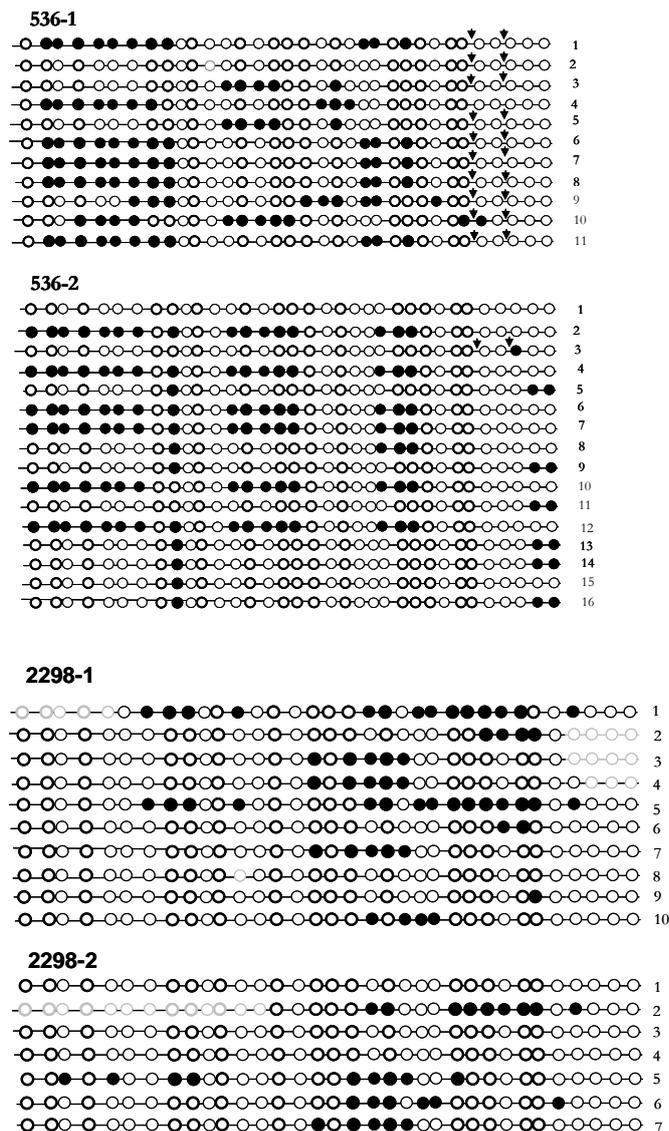
### 1804

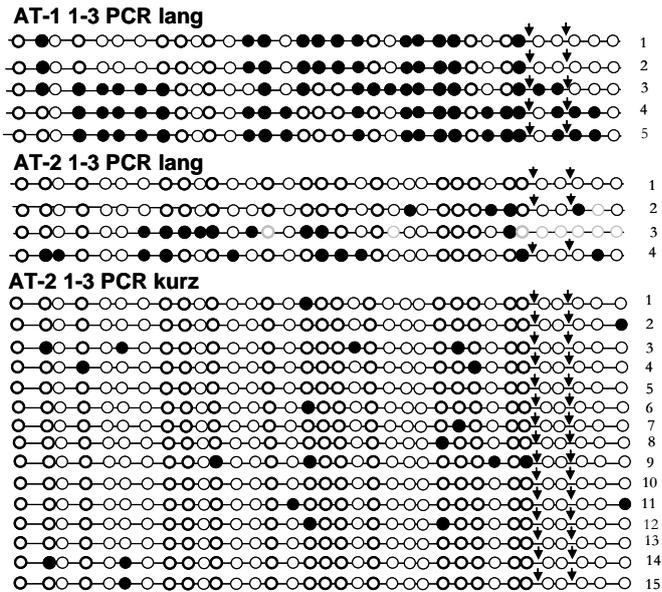


### Abb. 44 hCpG1.3/CH.

Ergebnisse der Sequenzierung nach Klonierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ von 3 CH-Patienten

Zwei der Patienten mit Schilddrüsenfehlbildungen und konnataler Hypothyreose zeigten im Vergleich zum Wildtyp deutlich stärker methylierte Sequenzen (Abb. 45). Der erste CH-Patient (536) zeigte in zwei verschiedenen Versuchsansätzen eine Methylierung von **25%** (374 CpGs aus 11 Klonen) und **22%** (544 CpGs aus 16 Klonen). Der zweite CH-Patient (2298) zeigte eine Methylierung von **17 %** (324 CpGs aus 10 Klonen) und **13%** (225CpGs aus 7 Klonen) in zwei unabhängigen Versuchen. In einer Kontroll-DNA fand sich ebenfalls eine Hypermethylierung. Bei genauerer Anamnese ergab sich, dass bei der Kontrollperson eine Autoimmunthyreoiditis (AT) vorliegt, so dass sie mit in das Patientenkollektiv aufgenommen wurde. Diese „Kontrolle“ zeigte in zwei unabhängigen Versuchen eine deutlich erhöhte Methylierung von **47 %** (170 CpGs aus 5 Klonen) und **18 %** (127 CpGs aus 4 Klonen). Ein dritter Versuch zeigte eine unauffällige Methylierung von **4 %** (510 CpGs aus 15 Klonen).





**Abb. 45 hCpG1.3/Patienten.**

Ergebnisse der Sequenzierung nach Klonierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ von 2 CH-Patienten und einem Patienten mit AT

Unterschiede zwischen den drei Versuchen des Patienten mit AT ergab die Wahl der Primer. Für die ersten beiden Versuche wurden die Vorwärtsprimer 1.3 gewählt, für den dritten Versuchsansatz die weiter 3'-gelegenen Vorwärtsprimer 1.3b. Bei allen stärker methylierten Sequenzen dieser Patienten fiel auf, dass einige Cytosine, die nicht Teil eines CpG-Dinukleotids waren, in der Sequenz anstatt des erwarteten Thymins als Cytosin erschienen (Abb. 46). So erschien es möglich, dass durch die Wahl der weiter 3' gelegenen Vorwärtsprimer, die singuläre Thymine in ihrer Sequenz enthalten, bei dem Patient mit Autoimmunthyreoiditis in der PCR eine Selektion der nicht methylierten Fraktion stattgefunden hat.



Um sicherzustellen, dass die auffälligen Befunde der Hypermethylierung der sequenzierten Klone repräsentativ für die gesamte PCR waren, wurde eine Methylierungs-spezifische PCR (MS-PCR) mit speziellen "nested" Primern durchgeführt. Dazu wurde ein Vorwärts-Primer gewählt, der in seiner Sequenz variable Cytosine/Thymine und zwei methylierte CpG-Dinukleotide enthielt (Primer Cdeg: 5´gaa att/c aat att tt/ca gaa tga att t/ctt/ccgc 3), um die methylierte Fraktion zu erfassen, sowie ein zweiter Vorwärtsprimer an identischer Position bei dem alle Cytosine durch ein Thymin ersetzt wurden, um die unmethylierte Fraktion zu erfassen (Primer Tdeg:5´gaa att aat att tta gaa tga att ttt tgt3´)(Abb. 46). Als Rückwärtsprimer wurde hCpG1-3Rin eingesetzt (PCR-Parameter: Fragmentlänge 180bp, Annealingtemperatur 63°C, Taq-Polymerase). Dabei zeigten sich bei drei ausgewählten PCRs (AT, 536, 2298), die zuvor in der Klonierung stärker methyliert waren, deutliche Banden aus der MS-PCR mit dem Cdeg-Primer und mit dem Tdeg-Primer. 3 mittels MS-PCR untersuchte Kontrollen zeigten hingegen lediglich ein PCR-Produkt mit dem Tdeg-Primer (Abb. 47).

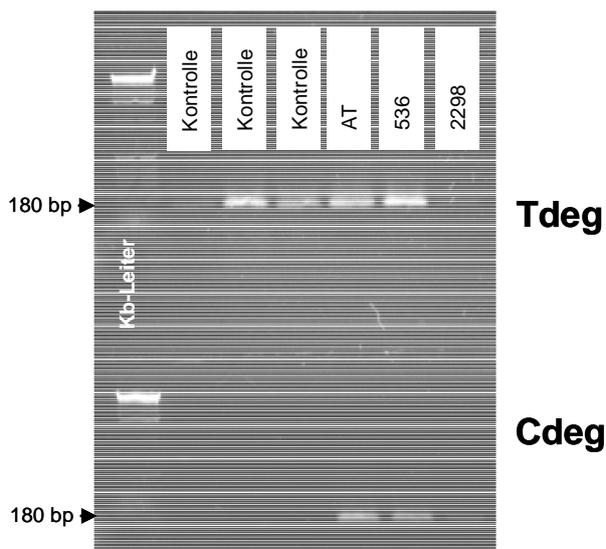
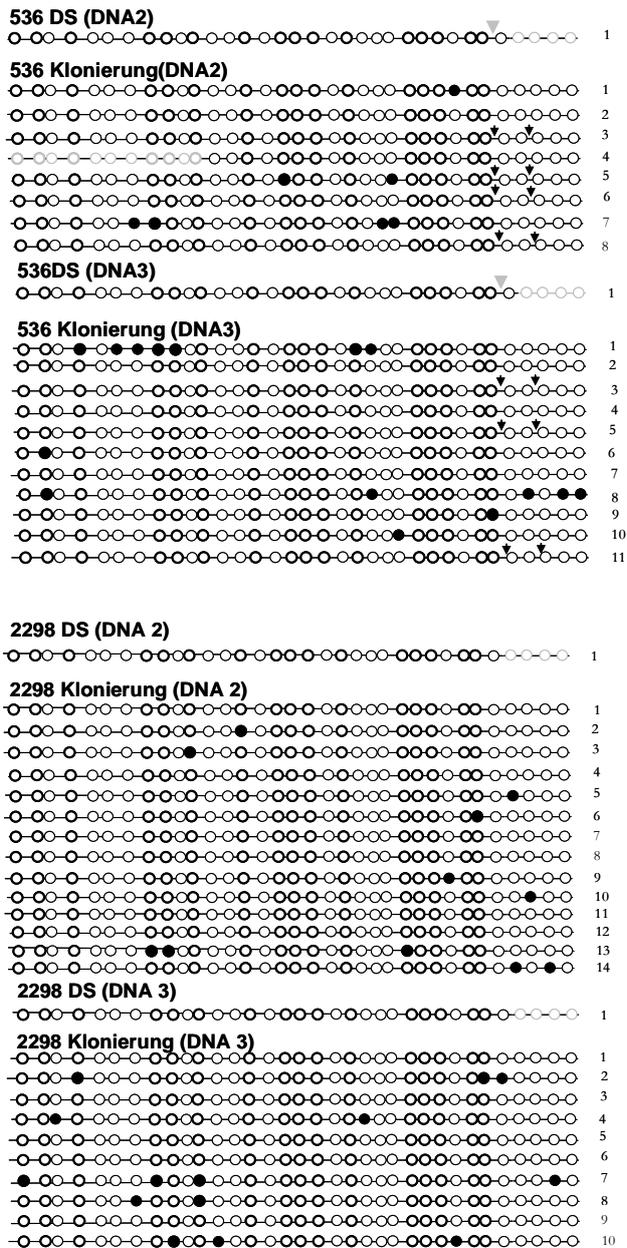


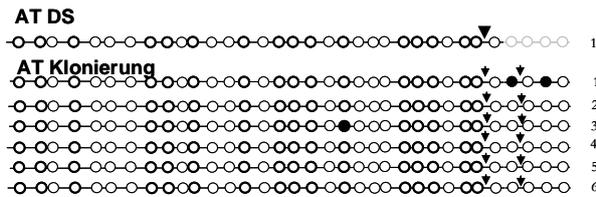
Abb. 47 MS-PCR

#### 4.5.4.1 Alternatives Bisulfit-Protokoll hCpG1.3.

Die bisherigen Ergebnisse legten eine Hypermethylierung des Fragmentes 1.3 bei 3 Patienten nahe. Um auszuschließen, dass der Befund durch einen methodischen Artefakt der Bisulfitbehandlung zustande kommt, wurden die drei Patienten mit den auffälligen Befunden in hCpG1-3 mit einer weiteren Bisulfit-Technik nach Zeschnigk et al. untersucht. Hierbei wurden pro Ansatz 2 µg DNA eingesetzt, so dass eine neue Blutabnahme mit anschließender DNA-Extraktion erforderlich war. Bei den Patienten

mit CH wurden zwei DNA-Proben von zwei unterschiedlichen Blutentnahmen untersucht. Dabei ließ sich in der Direktsequenzierung keine erhöhte Methylierung nachweisen. In den Sequenzen nach Einklonierung zeigte sich eine Methylierung von **3%** (261 CpGs aus 8 Klonen) und **4%** (374 CpGs aus 11 Klonen) (Patient 536) und eine Methylierung von **2%** (476 CpGs aus 14 Klonen) und **4%** (340 CpGs aus 10 Klonen) (Patient 2298). Die Direktsequenzierung der neu extrahierten DNA der Patientin mit Autoimmunthyreoiditis zeigte ebenfalls keine Methylierung, die Sequenzierung von 6 Klonen (204 CpGs) ergab eine Methylierung von **3%** (Abb. 48).





**Abb. 48 hCpG1.3/ 536, 2298, AT**

Direktsequenzierung und Sequenzierung nach Klonierung Bisulfitprotokoll nach Zeschnigk et al.

Daraufhin wurden die neu extrahierten DNA-Proben noch einmal mit der Bisulfittechnik nach Hajkova et al. untersucht. Hierbei zeigte sich in der Direktsequenzierung verschiedener Versuchsansätze keine Methylierung (Abb. 49).



**Abb. 49 hCpG1.3/ 536, 2298, AT;**

Direktsequenzierung Bisulfitprotokoll nach Hajkova et al.

#### 4.5.5 Zusammenfassung der DNA-Methylierung bei Patienten mit SD-Fehlbildungen

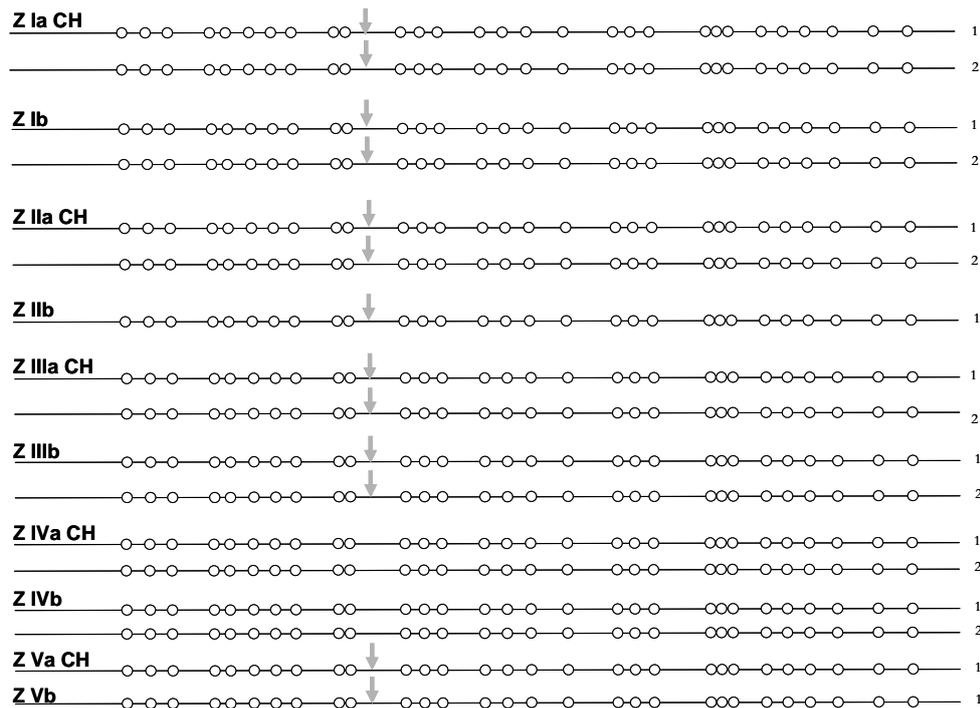
Bei den Patienten mit Schilddrüsenfehlbildungen zeigten sich mit den Kontrollproben vergleichbare DNA-Methylierungsmuster im Bereich hCpG-1 sowie im 5'-Bereich der hCpG1.1. Zunächst auffällige hypermethylierte Muster im 3'-Bereich der hCpG1 bei 3 Patienten ließen sich mit einer zweiten Methode nicht bestätigen.

#### 4.6 Ergebnisse der Methylierungsanalyse bei Zwillingen mit diskordanter konnataler Hypothyreose

Untersucht wurden die Fragmente hCpG-1, hCpG1.1, hCpG1.2 und hCpG1.3 in Leukozyten-EDTA-Blut bei allen fünf in Tabelle 2 beschriebenen Zwillingspaaren. Bei Zwillingsspaar I wurde zusätzlich die Methylierung von hCpG1.3 in der Wangenschleimhaut analysiert.

#### 4.6.1 Ergebnisse hCpG -1

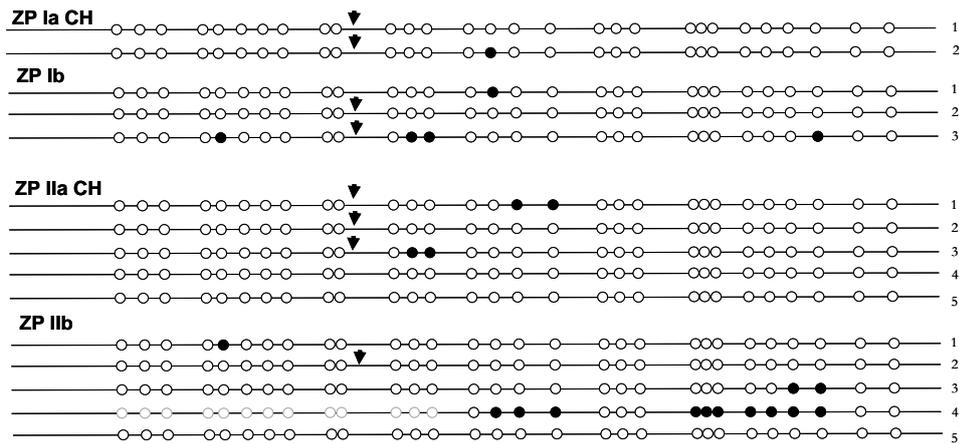
In der Analyse von hCpG-1 stellte sich das Methylierungsmuster bei allen erkrankten und gesunden Zwillingen entsprechend dem Wildtypmuster gering methyliert dar. Für jede Person wurden ein bis zwei Direktsequenzen unabhängiger Versuche ausgewertet (Abb. 50). Aus der genomischen Sequenzierung war bekannt, dass die Zwillingspaare I, II, III und V den unter 3.5.1 beschriebenen +T-Polymorphismus in heterozygoter Form aufwiesen. Dieser ließ sich gut in den Bisulfitsequenzen darstellen.



#### Abb. 50 hCpG-1/Zwillinge/DS

Ergebnisse der Direktsequenzierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ; Zwilling a ist an CH erkrankt, Zwilling b ist gesund

Bei den Zwillingspaaren I und II wurde jeweils ein weiterer Versuch nach Einklonierung ausgewertet. Dabei zeigte sich eine Methylierung von **2%** (58 CpGs aus 2 Klonen) (Ia) gegenüber **6%** (87 CpGs aus 3 Klonen) (Ib) und eine Methylierung von **3%** (145 CpGs aus 5 Klonen) (IIa) gegenüber **10%** (132 CpGs aus 5 Klonen) (IIb) (Abb. 51).

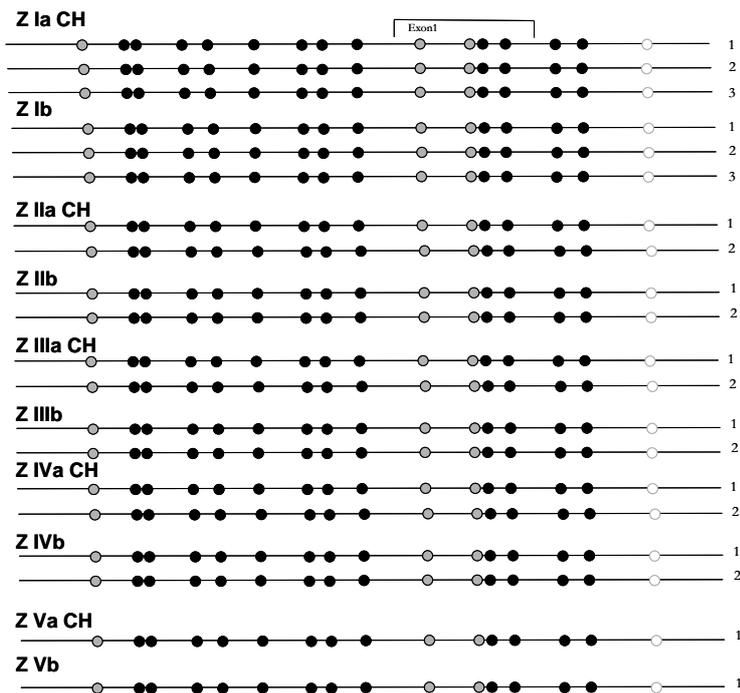


**Abb. 51 hCpG-1/Zwillinge/Klonierung**

Ergebnisse der Sequenzierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ nach Klonierung

#### 4.6.2 Ergebnisse hCpG 1.1

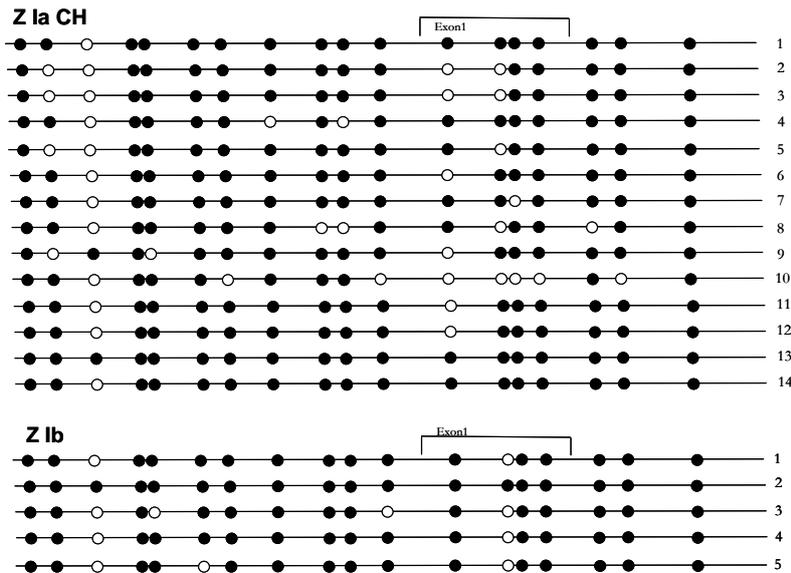
Im Fragment hCpG1.1 zeigte sich eine starke Methylierung, die in der Direktsequenzierung bei allen untersuchten Zwillingspaaren zu dem gleichen Muster führte. Ausgewertet wurden ein bis drei Versuche der jeweiligen Individuen (Abb. 52).



**Abb. 52 hCpG1.1/Zwillinge/DS**

Ergebnisse der Direktsequenzierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ

Zusätzlich wurden vom Zwillingsspaar I 14 Klone (252 CpGs) des CH-Patienten sowie 5 Klone (90 CpGs) des nicht betroffenen Zwillings aus einem weiteren Versuch ausgewertet. Diese ergaben eine Methylierung von **84** und **88 %** (Abb. 53).

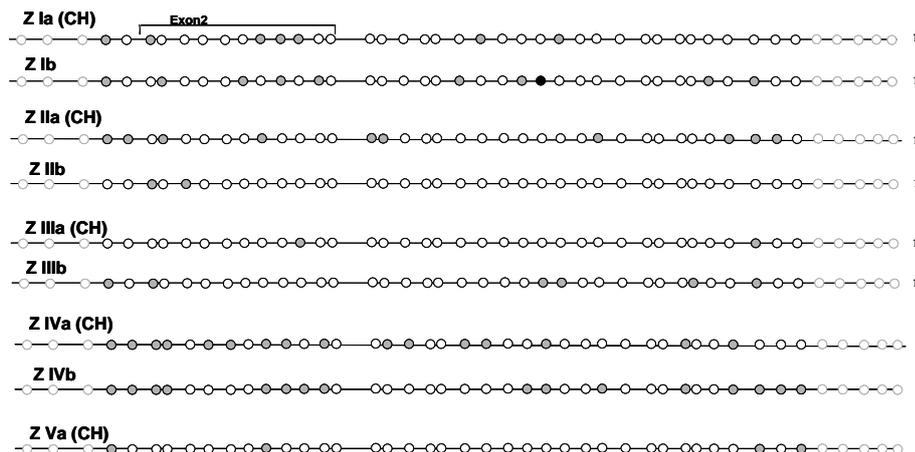


**Abb. 53 hCpG1.1/Zwillinge/Klonierung**

Ergebnisse der Sequenzierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ nach Klonierung

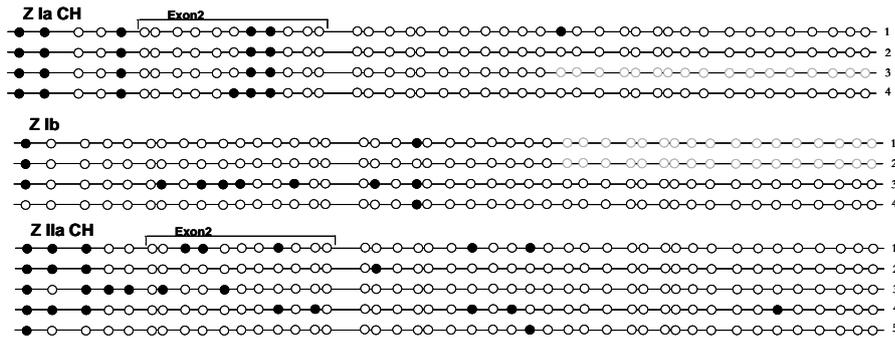
#### 4.6.3 Ergebnisse hCpG 1.2

Untersucht wurden die Zwillingspaare I bis IV sowie der erkrankte Zwilling Va. Dabei zeigte sich in der Auswertung aller Sequenzen das bei gesunden Probanden beobachtete Übergangsmuster zwischen stark methyliertem hCpG1.1- und kaum methyliertem hCpG1.3-Bereich ohne signifikante Unterschiede der Zwillinge (Abb. 54, Abb. 55).



**Abb. 54 hCpG1.2/Zwillinge/DS**

Ergebnisse der Direktsequenzierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ

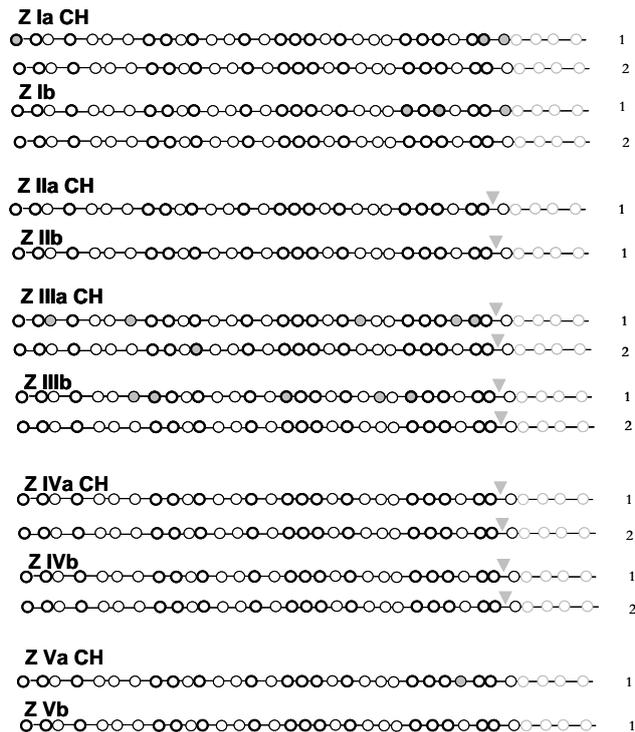


**Abb. 55 hCpG1.2/Zwillinge/Klonierung**

Ergebnisse der Sequenzierung von Bisulfid-umgewandelter DNA aus LZ nach Klonierung

#### 4.6.4 Ergebnisse hCpG 1.3

Alle Zwillingspaare wurden in ein bis zwei Bisulfidversuchen untersucht und mittels Direktsequenzierung ausgewertet. Dabei ergaben sich keine signifikanten Abweichungen zu der Wildtypmethylierung (Abb. 56). Bei den Paaren II, III und IV ließ sich der bekannte heterozygote Guanin- zu Adenin-SNP in der Bisulfidsequenz gut darstellen.



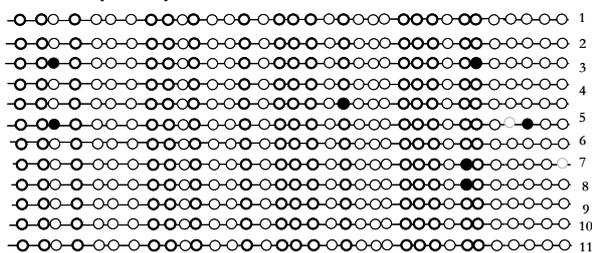
**Abb. 56 hCpG1.3/Zwillinge/DS**

Ergebnisse der Direktsequenzierung von Bisulfid-umgewandelter DNA aus LZ

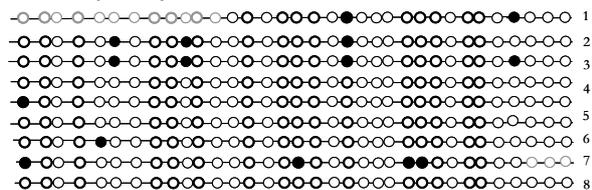
Zusätzlich wurden die Bisulfid-umgewandelten PCRs von 3 Zwillingspaaren (I bis III) aus weiteren Versuchen einkloniert und sequenziert (Abb. 57). Aufgrund der unter 4.3.4

beschriebenen diskrepanten Ergebnisse unterschiedlicher DNAs des gleichen Individuums wurden bei Zwillingpaar I die Versuche von 3 (Ia) bzw. 2 DNAs (Ib) aus unterschiedlichen Blutentnahmen ausgewertet. Dabei zeigte sich bei Zwilling Ia eine Methylierung von **2%** (372 CpGs aus 11 Klonen), **6%** (257 CpGs aus 6 Klonen) und **3%** (373 CpGs aus 11 Klonen), bei Zwilling Ib eine Methylierung von **5%** (442 CpGs aus 13 Klonen) und **3%** (272 CpGs aus 8 Klonen). Bei dem Zwillingpaar II zeigte sich eine Methylierung von **2%** (170 CpGs aus 5 Klonen) (IIa) gegenüber **0%** (34 CpGs aus 1 Klon) (IIa), bei dem Zwillingpaar III eine Methylierung von **4%** (212 CpGs aus 7 Klonen) (IIIa) gegenüber **3%** (61 CpGs aus 2 Klonen) (IIIb).

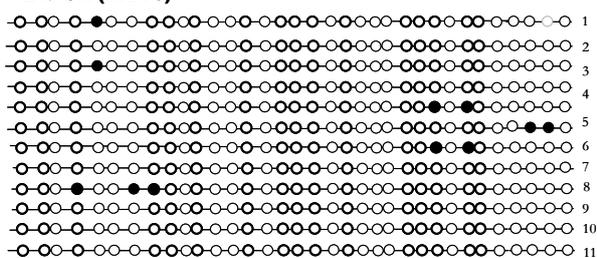
#### Z Ia CH (DNA 1)

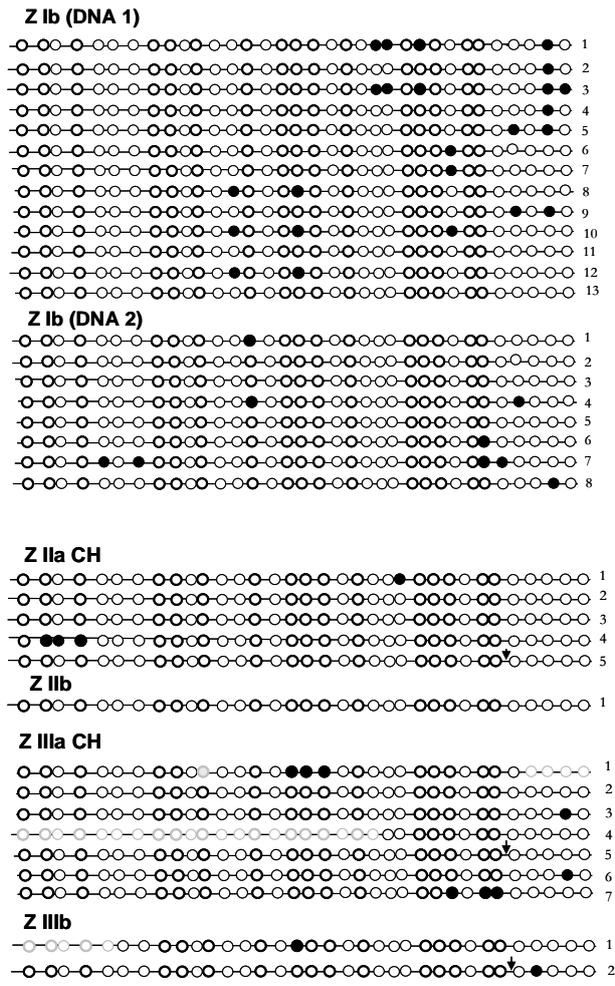


#### Z Ia CH (DNA 2)



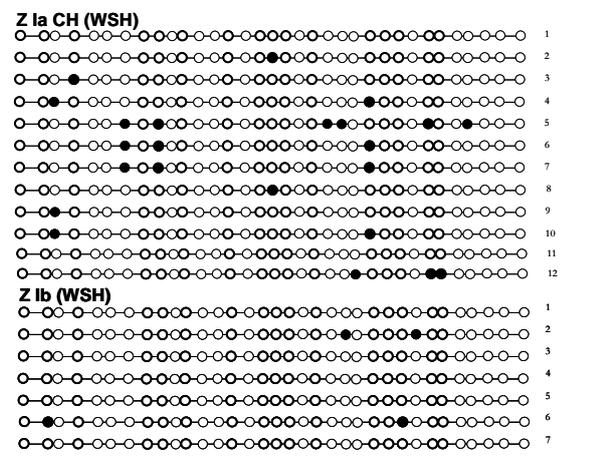
#### Z Ia CH (DNA 3)





**Abb. 57 hCpG1.3/Zwillinge/Klonierung**  
 Ergebnisse der Sequenzierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus LZ nach Klonierung

Bei dem Zwillingsspaar I wurde zusätzlich das Methylierungsmuster in der Wangenschleimhaut analysiert. Dies ergab eine Methylierung von **6%** (408 CpGs aus 12 Klonen) (Ia) gegenüber **2%** (238 CpGs aus 7 Klonen) (Ib) (Abb. 58).



**Abb. 58 hCpG1.3/Zwillinge/WSH**  
 Ergebnisse der Sequenzierung von Bisulfit-umgewandelter DNA aus WSH nach Klonierung

#### **4.6.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der DNA-Methylierung bei Zwillingen mit diskordanter konnataler Hypothyreose**

In allen untersuchten Fragmenten liessen sich keine Unterschiede im Methylierungsmuster der DNA innerhalb eines Zwillingspaars sowie im Vergleich zu den Kontrollpersonen nachweisen.

## 5 Diskussion

Ein wesentlicher Bestandteil der epigenetischen Regulation der Genexpression ist die DNA-Methylierung an CpG-Dinukleotiden, bei der Veränderungen zur Aktivierung von nicht transkribierten Genen bzw. zur Inaktivierung von transkribierten Genen führen und damit zur Entstehung von Krankheiten beitragen können. Eine veränderte DNA-Methylierung ist vielfach bei Imprinting-Erkrankungen sowie Tumorerkrankungen beschrieben worden. Imprinting-Erkrankungen sind historisch gesehen die Ersten, bei denen ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Erkrankung und veränderter DNA-Methylierung beschrieben werden konnte, so dass das Studium der DNA-Methylierung bei Imprinting-Erkrankungen in den folgenden Jahren besonderes Interesse fand (Glenn et al. 1993; Reis et al. 1994). Auch für die Tumorerkrankungen wurde früh ein Zusammenhang zwischen veränderter DNA-Methylierung und Transkriptionsverlust gesehen (Greger et al. 1989). Bei dem Studium an Tumoren kommt erleichternd die Verfügbarkeit von Biopsien hinzu, die eine Untersuchung an unmittelbar betroffenem Gewebe erlaubt. Bisher gibt es nur wenige Beschreibungen über veränderte DNA-Methylierung und Erkrankungen, die keiner der oben genannten Gruppen zugeordnet werden können. Lediglich eine erst kürzlich publizierte Arbeit stellt einen Zusammenhang zu einer Organmalformation her (Oates et al. 2006). Dennoch ist es vorstellbar, dass ein Gen, das in der Entwicklung eine entscheidende Rolle spielt ähnlich wie ein Tumor-Suppressor-Gen, epigenetisch abgeschaltet wird. Dabei sind Krankheiten, die in ihrem Vererbungsmuster nicht den Mendelschen Regeln folgen, gute Modelle, um epigenetische Hypothesen zu verfolgen: Die Krankheit sollte sporadisch auftreten und ein weites Phänotypenspektrum bieten. Zusätzlich sollten diskordante monozygote Zwillinge in der Literatur beschrieben worden sein (Horsthemke 2006).

Die primäre konnatale Hypothyreose als häufigster angeborener Defekt des endokrinen Systems erfüllt diese Kriterien: Die Schilddrüsendysgenesien, die ätiologisch mit 75-80% die größte Gruppe der konnatalen Hypothyreosen bilden, treten überwiegend sporadisch auf, nur wenige familiäre Fälle sind beschrieben worden. Von 13 in der Literatur beschriebenen monozygoten Zwillingen mit konnataler Hypothyreose sind 12 Zwillinge hinsichtlich ihrer konnatalen Hypothyreose diskordant. Epidemiologische Daten mit einer weltweit nahezu gleich hohen Inzidenz sowie ein Jahreszeiten-

unabhängiges Auftreten der Erkrankung sprechen gegen Umweltfaktoren als primäre Ursache für die Entstehung der Erkrankung und für einen endogen-pathogenen Faktor. In einigen Fällen wurden Mutationen in den Kandidaten-Genen *PAX8*, *NKX2.1* und *FOXE-1*, die zu einem Entwicklungsdefekt der Schilddrüse führen, identifiziert. Unter diesen sind Mutationen im *PAX8* die Einzigen, die bei hoher Phänotypenvariabilität zu einer isolierten Hypothyreose führen können. Bei allen anderen nachgewiesenen Mutationen in den Genen *NKX2.1* sowie *FOXE-1* handelt es sich um syndromale Erkrankungen.

Um die Voraussetzung für die Fragestellung zu schaffen, ob epigenetische Veränderungen ähnlich einer *PAX8*-Funktionsverlust-Mutation beim Menschen zur Ausbildung einer konnatalen Hypothyreose führen können, wurde in dieser Arbeit die DNA-Methylierung im *PAX8*-Gen untersucht. Dazu wurden zunächst die CpG-reichen Regionen im *PAX8* identifiziert und hinsichtlich ihrer normalen Methylierung charakterisiert, um diese später mit dem Methylierungsmuster der Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen vergleichen zu können.

### **5.1 Bedeutung der Position der identifizierten humanen CpG-Islands**

Insgesamt konnten drei Bereiche mit einer hohen Dichte von CpG-Dinukleotiden, die im Pipmaker-Programm als CpG-Inseln definiert wurden, in der Region vom humanen *PAX8*-Gen identifiziert werden (hCpG-1, hCpG1, hCpG2).

Die **hCpG-1**-Insel liegt 48 kb 5' vom Transkriptionsstart des *Pax8*-Gens entfernt. Diese wurde bei Homologiestudien für die putativen Enhancerbereiche des *Pax8* identifiziert und liegt bei den verschiedenen Spezies hochgradig konserviert vor. Ergebnisse aus Funktionessays in Mausversuchen sprechen für eine funktionelle Relevanz dieses Bereiches (unpublizierte Daten, persönliche Mitteilung Prof. R. Di Lauro, Stazione Zoologica Anton Dohm and Department of Cellular and Molecular Biology and Pathology, University of Naples). Enhancer verstärken spezifisch die Transkription eukaryotischer Gene, so dass vorstellbar ist, dass Veränderungen in der DNA-Methylierung von Enhancern Einfluß auf die Transkription haben können. Zusammenhänge zwischen DNA-Methylierung, Genexpression und Enhancer-Aktivität sind bereits in der Literatur bei Imprinting-Genen wie den *Igf2/H19*-Genen sowie dem *Rasgrf1*-Gen beschrieben worden (Bell et al. 2000; Hark et al. 2000; Kantor et al. 2004; Yoon et al. 2005).

Der untersuchte Bereich **hCpG1** setzt sich aus zwei CpG-reichen Regionen zusammen. Der 5'-gelegene Bereich **hCpG1.1** liegt unmittelbar im Bereich des Transkriptionsstartes und entspricht damit der klassischen Position einer CpG-Insel im putativen Promotorbereich eines Gens. Der Promotorbereich des *PAX8* ist bislang nicht funktionell definiert, dennoch ist die Koinzidenz zwischen CpG-Inseln und Promotoren im Genom bemerkenswert (Bird et al. 1987). Analysen zeigen, dass diese im 5'-Bereich gelegenen CpG-Inseln häufig in vivo durch Transkriptionsfaktoren besetzt werden (Cuadrado et al. 2001). Ein Zusammenhang zwischen Methylierung von Promotoren und Transkription ist mittlerweile gut etabliert (Bird 2002).

Der 3'-gelegene Bereich der Region hCpG1 liegt im Intron 2 (**hCpG1.3**). Es wurde gezeigt, dass ein CpG-Insel beinhaltendes Intron 2 des *Igf2r*-Gens (Wutz et al. 1997) (Lyle et al.) ebenso wie ein CpG-Insel beinhaltendes Exon 2 des Klasse II-MHC-Gens (Macleod et al. 1998) als aktive Promotoren fungieren. Somit kann die Region hCpG1.3 potentiell ebenfalls eine Promotorfunktion haben. Die durch das Humane Epigenom-Projekt (HEP) bisher am weitesten angelegte Studie zur Erfassung von Daten zur Methylierung von Promotoren definiert als putative Promotorregion einen Bereich, der zwischen 2kb 5' und 500 bp 3' vom Transkriptionsstart entfernt liegt (Rakyan et al. 2004). Alle weiter 3'-gelegenen untersuchten Bereiche werden vom HEP als „intragenisch“ bezeichnet. Somit liegt die untersuchte Region hCpG1 nach der Definition des HEP im Promotorbereich.

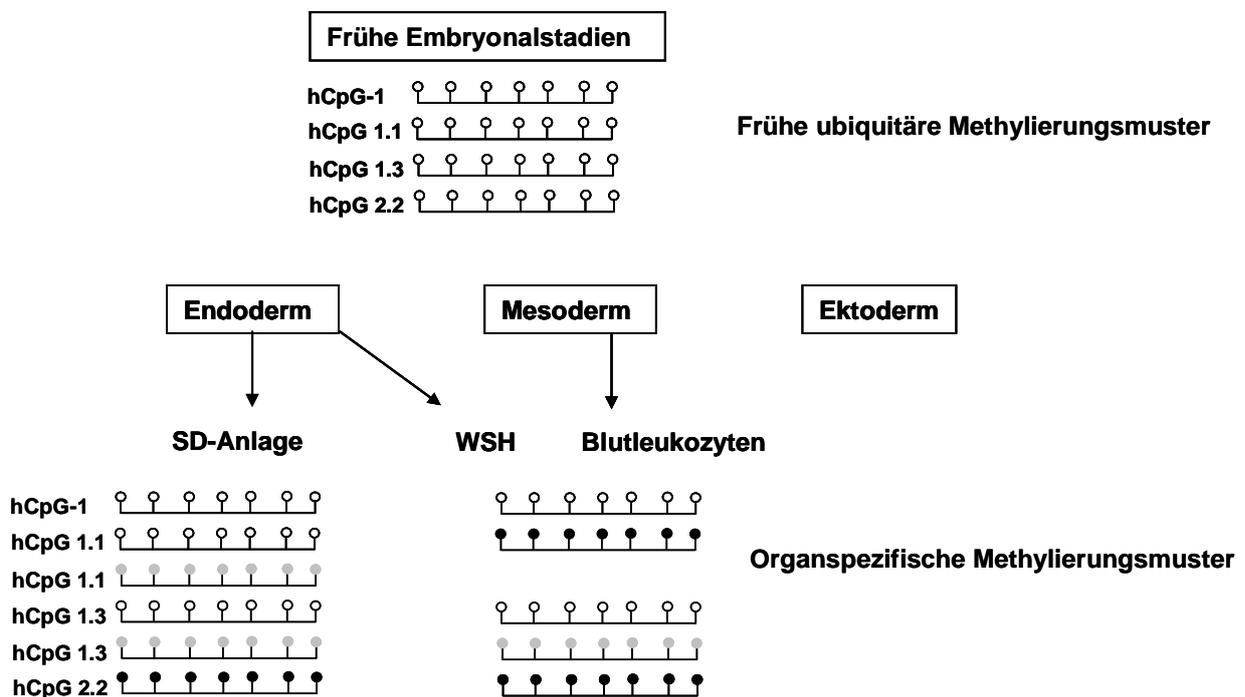
Nach dieser HEP-Definition ist die dritte Insel **hCpG2**, die sich zwischen dem Exon 8 und Exon 9 des *PAX8*-Gens befindet und den größten Teil des Intron 8 bildet, „intragenisch“ gelegen. Diese Insel ist durch eine 14 fach amplifizierte, CpG enthaltende Sequenz von 44 bp entstanden und ist einer der Bereiche, in dem im *PAX8*-Gen ein alternatives Splicing stattfindet. Verschiedene Splice-Varianten sind für das *PAX8*-Gen beschrieben worden, deren biologische Bedeutung bislang nicht klar ist.

## **5.2 Diskussion der Methylierung im *PAX8*-Gen**

### **5.2.1 Untersuchung der Methylierung humaner DNA in peripheren Leukozyten**

In der Methylierungsanalyse von DNA extrahiert aus Blutleukozyten mehrerer adulter Probanden konnte für alle gewählten Bereiche im *PAX8*-Gen ein eindeutiges Methylierungsmuster beschrieben werden (Abb. 32). Dabei zeigte sich das in einem putativen Enhancer-Bereich liegende Fragment hCpG-1 hypomethyliert (1-2%). Die

hCpG1 zeigte sich um den Transkriptionsstart hypermethyliert (79 bis 91%), im mittleren Teil deutlich geringer methyliert (16 bis 27%) und im 3'-Bereich hypomethyliert (0-7%). Die Methylierung der zweiten CpG-Insel konnte aufgrund technischer Limitierung bedingt durch ein Wiederholungsmotiv nur in einem kleinen 3'-gelegenen Bereich ausgewertet werden und zeigte dort stark methylierte Werte zwischen 74 und 98%. Alle zusätzlich ausgewerteten Direktsequenzen weiterer Versuche bestätigten die Hypo- bzw. Hypermethylierung der entsprechenden Fragmente. Die CpG-Inseln im *PAX8*-Gen liegen demnach größtenteils bimodal methyliert vor: sie zeigen entweder ein hypomethyliertes oder ein hypermethyliertes Muster (Abb. 59).



**Abb. 59 Methylierungsmuster im *PAX8*-Gen**

weißer Kreis=unmethyliert, schwarzer Kreis= methyliert, grauer Kreis: Hypothese einer fehlerhaften DNA-Methylierung während der Entwicklung

Dieses bimodale Muster deckt sich mit den Ergebnissen des HEP, die in ihrer Pilotstudie über die Methylierung des MHCs bei 90% der untersuchten Amplikons entweder eine Hypo- (entsprechend einer Methylierung unter 30%) oder eine Hypermethylierung (entsprechend einer Methylierung über 70%) beobachten konnten (Rakyan et al. 2004). Dabei zeigten sich die Amplikons in der HEP-Studie, die in dem putativen Promotorbereich lagen, hypomethyliert mit einer durchschnittlichen Methylierung von 10% wohingegen sich die intragenisch gelegenen Amplikons mit einer durchschnittlichen Methylierung von 86% stark methyliert darstellten. Diese klar definierte Bimodalität wurde in der Pilotstudie des HEP zur Charakterisierung der DNA-

Methylierung im Bereich der Chromosomen 6, 20 und 22 bestätigt (Eckhardt et al. 2006) und wurde auch bereits von anderen Autoren beschrieben (Bird 2002).

### 5.2.2 Untersuchung der Methylierung im Gewebevergleich

Untersucht wurden verschiedene Gewebe wie Blutleukozyten, SD und WSH verschiedener adulter Probanden. Die Auswertung der Versuche nach Einklonierung und nach Direktsequenzierung Bisulfit-umgewandelter DNA in den Fragmenten hCpG-1, hCpG1.2, hCpG1.3 und hCpG2.2 ergaben keine signifikanten Unterschiede. Ein deutlicher Unterschied fand sich jedoch in dem im Bereich des Transkriptionsstart liegenden Fragment hCpG1.1 (Tabelle 5). Dabei zeigte sich in der Auswertung der Sequenzen nach Einklonierung der Amplikons die oben beschriebene Hypermethylierung mit Werten zwischen 71 und 90 % in der Leukozyten- und WSH-DNA. Die Auswertung der Methylierung an SD-DNA ergab deutlich niedrigere Werte von 6-25% nach Einklonierung. Die Direktsequenzierungen zeigten ebenfalls hypermethylierte Sequenzen von Leukozyten-DNA gegenüber hypomethylierten Sequenzen von SD-DNA (Abb. 21). Das hypomethylierte Muster der Schilddrüse als *PAX8*-exprimierendes Organ in der Region des Transkriptionsstartes setzt sich damit deutlich von den hypermethylierten Mustern der nicht *PAX8*-exprimierenden Gewebe Blutleukozyten und WSH ab, so dass ein gewebespezifischer Zusammenhang zwischen hypomethylierter hCpG1 und Expression von *PAX8* bestehen könnte.

Fragment	LZ-Methylierung [%]	SD-Methylierung [%]	WSH-Methylierung [%]
<b>hCpG-1</b>	1-2	1-2	1-2
<b>hCpG1.1</b>	<b>71-79</b>	<b>6-25</b>	<b>90</b>
<b>hCpG1.3</b>	0-7	0-5	
<b>hCpG2.2</b>	74-98	89	94

**Tabelle 5 Übersicht Wildtyp-Methylierung im Gewebevergleich**  
Ergebnisse der Methylierung in % nach Einklonierung

Daten über das Ausmaß von gewebespezifischer Methylierung gibt es in der Literatur nur wenige. Die ersten Ergebnisse des HEP konnten zeigen, dass nur 10% aller in dieser Studie untersuchten Amplikons Unterschiede in der Methylierung bei verschiedenen Geweben aufwiesen. Dabei konnte bei einigen eine Korrelation zwischen Gewebespezifität und Expression hergestellt werden (*C2*-Gen, *DOMZ3*-Gen), wobei auch hier das exprimierende Gewebe hypomethyliert und das nicht

exprimierende Organ hypermethyliert vorlag. Eine gewebespezifische Methylierung ist ebenfalls für das *TNXB*-Gen gezeigt worden, das nur in Muskelzellen hypomethyliert vorliegt. Dies korreliert mit der zeitlich regulierten gewebespezifischen Expression von *TNXB*, dem eine Rolle in der Entwicklung von Herz, Muskel und Gliedmaßen zugesprochen wird (Burch et al. 1995). Daher liegt die Vermutung nahe, dass epigenetische Veränderungen einen regulatorischen Einfluß auf die spezifische Gewebeexpression haben können.

Auch die bislang einzige publizierte Arbeit zur DNA-Methylierung von *Pax*-Genen postuliert Veränderungen im Methylierungsmuster als potentiellen Kontrollmechanismus für die normale Transkription von *Pax*-Genen (Kay et al. 1997).

Die Frage, warum keine generelle Übereinstimmung zwischen Gewebeexpression und Methylierungsmuster aller Gene besteht, bleibt bislang unbeantwortet. Einerseits ist vorstellbar, dass nur bei einem kleinen Teil der Gene die gewebespezifische Expression durch Methylierung reguliert wird. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass eine gewebespezifische Methylierung nur während der frühen Entwicklungsstufen vorliegt und zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr erfassbar wäre. Dafür sprechen auch Daten des HEP, die für einige Gene zeigen konnten, dass sie in fetalem Gewebe anders methyliert vorlagen als in adultem Gewebe. Eine weitere Erklärung für das unterschiedliche Methylierungsmuster des *PAX8*-Gens in verschiedenen Geweben könnte durch die Beobachtung gegeben werden, dass ein Teil der humanen CpG-Inseln einer progressiven Methylierung im Laufe der Zeit unterliegt (Issa 2000) und dass das zunächst gesamt hypomethylierte *PAX8*-Gen in allen nicht exprimierenden Organen methyliert wird und die Schilddrüse aus bislang unbekanntem Gründen davor geschützt bleibt. Interessant wäre es auch, zu zeigen, wie sich das Methylierungsmuster in der Niere als ebenfalls *Pax8*-exprimierendes Organ verhält. Eine detaillierte Darstellung der organspezifischen Methylierung des *Pax8*-Gens während früher embryonaler Entwicklungsschritte könnte diese Fragen beantworten.

### **5.2.3 *Pax8*-Methylierung der Maus**

Das Genom der Maus enthält ca. 15500 CpG-Inseln von denen 10000 im Vergleich zum Menschen als hoch konserviert gelten (Waterston et al. 2002). Dabei scheinen besonders die im Promotorbereich liegenden CpG-Inseln hochgradig konserviert zu sein. Das HEP veröffentlichte kürzlich Daten zu der ersten vergleichenden Studie über

die DNA-Methylierung bei Mensch und Maus (Eckhardt et al. 2006). Dabei konnte gezeigt werden, dass circa 70% der konservierten Regionen ein ähnliches DNA-Methylierungsmuster zeigten.

Beim Vergleich der humanen Sequenzen und der Maus-Sequenzen im Bereich des *Pax8* zeigten sich die Regionen hCpG-1 als putativer Enhancer-Bereich und hCpG1 als putative Promotorregion in der Sequenz hoch konserviert.

Die hCpG2 liegt bei der Maus nicht konserviert vor. Beim Menschen scheint sie durch ein 44 Basenpaar langes Wiederholungsmotiv entstanden zu sein, das bei der Maus nur in einfacher Form vorliegt. Auch wenn in der vorliegenden Arbeit nur wenige Daten aus Maus-DNA generiert werden konnten, zeigten sich doch in allen Bereichen mit dem Menschen vergleichbare Ergebnisse der DNA-Methylierung. Der Bereich mCpG-1 stellte sich entsprechend der humanen hCpG-1 hypomethyliert dar. Der Bereich mCpG1 repräsentiert lediglich die homologe Region hCpG1.2 und hCpG1.3, da bei der Maus weiter 5' nur vereinzelt CpG-Dinukleotide zu finden waren, die nicht mit in die Analyse einbezogen wurden. Dabei zeigte die DNA-Methylierung im Bereich mCpG1.1 ebenfalls organspezifische Methylierungsmuster vergleichbar mit denen der humanen hCpG1.1 mit deutlich hypermethylierten Mustern in den nicht *Pax8*-exprimierenden Geweben wie Herz und Blutleukozyten gegenüber einem hypomethylierten Muster der *Pax8*-exprimierenden Schilddrüse.

Diese Ergebnisse unterstreichen die potentielle Bedeutung der Methylierungsmuster im *PAX8*-Gen. Sowohl die konservierte Position der CpG-Inseln als auch die konservierten Methylierungsmuster sprechen für eine wichtige Rolle dieser Sequenzen in der *PAX8*-Genfunktion.

### **5.3 Diskussion der Ergebnisse bei Patienten mit Schilddrüsenfehlbildungen sowie bei diskordanten Zwillingen mit CH**

Nach der detaillierten Beschreibung der CpG-spezifischen und gewebespezifischen Methylierung des *PAX8*-Gens wurde die Hypothese geprüft, ob sich Unterschiede dieser Muster bei Patienten mit SD-Fehlbildungen und bei diskordanten monozygoten Zwillingen nachweisen lassen.

### 5.3.1 Diskussion der Ergebnisse hCpG-1 und hCpG1.1

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die generelle Fragestellung, inwieweit sich Veränderungen in der DNA-Methylierung ubiquitär in allen Geweben oder nur organspezifisch abhängig von der Expression eines Gewebes darstellen lassen. Ausgangspunkt für die Entscheidung der Analyse an Blutleukozyten als nicht *PAX8*-exprimierendes Organ zu Beginn dieser Arbeit waren Beobachtungen einiger Publikationen, dass sich frühe Fehler in der Methylierung in Geweben aller drei Keimblätter widerspiegeln unabhängig davon, ob ein bestimmtes Gen exprimiert wird oder nicht. Diesbezüglich relevanteste Arbeit ist die von Tufarelli et al. (Tufarelli et al. 2003), in der eine Methylierungsveränderung der DNA in dem Alpha-Globin-Gen *HBA2* in einen pathogenetischen Zusammenhang mit der Entstehung einer Alpha-Thalassämie gebracht werden konnte. Obwohl alle humanen Alpha-Globin-Gene exklusiv in den Erythrozyten exprimiert werden, zeigte sich die veränderte DNA-Methylierung in allen untersuchten Geweben mit Ausnahme der Spermazellen, als Zeichen dafür, dass diese während der embryonalen Entwicklung stattgefunden hat (Barbour et al. 2000). Auch die Arbeitsgruppe von Suter et al. konnte zeigen, dass eine Hypermethylierung im Tumor-Suppressor-Gen *MLH1*, die mit einem erhöhten Risiko für Tumorerkrankungen einhergeht, sich in allen untersuchten somatischen Zellen aller drei Keimblätter wiederfand (Suter et al. 2004). Bei der erst kürzlich erschienenen Arbeit zur DNA-Methylierung im *AXIN1*-Gen bei diskordanten Zwillingen ließen sich die Veränderungen bei dem an einer Cauda-Duplikation erkrankten Zwilling nur im peripheren Blut und nicht in der WSH nachweisen. Da das Blut sich genau wie die bei dieser Erkrankung betroffenen Knochen vom Mesoderm ableitet, wird von den Autoren ein Methylierungsdefekt nach der Differenzierung der drei Keimblätter vermutet (Oates et al. 2006).

Bei der Schilddrüsendysgenese handelt es sich um einen sehr frühen Entwicklungsdefekt, so dass ein Methylierungsdefekt aller drei Keimblätter oder ein Defekt nur im Bereich des Endoderms, aus dem die SD-Anlage hervorgeht, vorstellbar ist (Abb. 59).

Für den putativen Enhancer-Bereich hCpG-1 für den ein hypomethyliertes Muster in allen untersuchten Gewebearten gesunder Probanden gezeigt werden konnte, zeigten sich bei allen untersuchten Patienten und diskordanten Zwillingen keine relevanten Unterschiede der *PAX8*-Methylierung.

Der 5'-Anteil des Bereiches hCpG1 (hCpG1.1), in dem ein gewebespezifisches Methylierungsmuster mit einer Hypomethylierung in der Schilddrüse und einer Hypermethylierung in Blutleukozyten und WSH gezeigt werden konnte, stellte sich bei allen Patienten in den untersuchten Blutleukozyten hypermethyliert dar.

Als Untersuchungsmaterial der in dieser Arbeit untersuchten Patienten mit Schilddrüsenfehlbildungen sowie der diskordanten Zwillinge mit konnataler Hypothyreose stand kein Schilddrüsengewebe zur Verfügung. Die DNA-Methylierung wurde daher ausschließlich an Blutleukozyten untersucht. Eine möglicherweise pathogenetisch relevante CpG1-1-Hypermethylierung in der Schilddrüse der Patienten kann daher nicht ausgeschlossen werden. Dies wäre aber von besonderer Bedeutung, da bisher unpublizierte Daten aus der eigenen Arbeitsgruppe in demselben Bereich ein verändertes Methylierungsmuster bei SD-Karzinomen aufweisen (Dissertation C. Holz). Untersucht wurden dabei 16 histologisch gesicherte follikuläre SD-Karzinome, von denen sich in der Direktsequenzierung nach Bisulfitbehandlung 2 hypermethyliert und 6 heterogen methyliert darstellten. Der Einfluß von Methylierungsveränderungen in der Pathogenese von Tumorerkrankungen ist gut beschrieben. Im Jahre 2006 sind bereits über 60 verschiedene Gene mit veränderten Methylierungsmustern in Tumoren bekannt ([www.mdanderson.org/departments/methylation](http://www.mdanderson.org/departments/methylation)), darunter auch das *PAX6*. Ob die beobachtete Hypermethylierung im *PAX8* bei den follikulären SD-Tumoren von funktioneller Bedeutung für die Expression von *PAX8* ist, wird derzeit in der eigenen Arbeitsgruppe untersucht. Ein solcher Schilddrüsen-spezifischer CpG1.1-Hypermethylierungsdefekt wie in SD-Tumoren beschrieben könnte als Ursache der SD-Dysgenese vorliegen. Um einen solchen Defekt nachzuweisen, müßte Schilddrüsenmaterial der betroffenen Patienten gewonnen werden. Dies ist nicht nur aus ethischer Sicht schwierig, da geeignetes Gewebe für eine molekulargenetische Untersuchung nur durch eine Feinnadelbiopsie zu gewinnen ist, sondern eine Aplasie oder eine starke Hypoplasie der Schilddrüse, bei der das Restgewebe zusätzlich strukturell stark verändert sein kann, wird eine Gewebeentnahme in den meisten Fällen nicht erlauben.

### 5.3.2 Diskussion der Ergebnisse hCpG1.3

Im Unterschied zu den SD-spezifisch hypomethylierten CpG 1.1 lag der 3'-gelegene Bereich hCpG1.3 bei gesunden Probanden in allen untersuchten Geweben hypomethyliert vor. Ausgehend von der Hypothese, dass ein Fehler, der in der frühen

Remethylierungsphase in allen drei Keimblättern auftritt, sich in allen untersuchbaren Geweben nachweisen liesse, könnte die Region des hypomethylierten putativen hCpG 1.3-Promotorbereichs einen Methylierungsfehler in Blutleukozyten aufweisen, der einen Defekt in der Schilddrüse mit anzeigt. Daher war der hCpG1.3 Methylierungsstatus bei Patienten mit Schilddrüsendysgenese von großem Interesse.

Dieser Bereich zeigte in den Blutleukozyten von drei untersuchten Patienten in den ersten Versuchsreihen auffällige hypermethylierte Muster, die in jeweils unabhängigen Versuchen reproduzierbar waren. Die Diagnose von zwei der Patienten lautete konnatale Hypothyreose aufgrund einer Schilddrüsendysgenese. Bei der dritten Person handelte es sich um eine zunächst als Kontrollperson vorgesehene Probandin, bei der eine genauere Anamnese eine Autoimmunthyreoiditis ergab. Diese Probandin wurde mit in die Patientengruppe aufgenommen, da in der Literatur eine Patientin mit *PAX8*-Mutation und Autoimmunerkrankung der Schilddrüse beschrieben worden ist (Congdon et al. 2001). Bei der in der Literatur beschriebenen Patientin handelt es sich um die Mutter eines an konnataler Hypothyreose erkrankten Mädchens, die klinisch lediglich eine leichte Hypothyreose bei normal großer Schilddrüse zeigte. Somit konnte man davon ausgehen, dass ein *PAX8*-Gendefekt sowohl zur konnatalen Hypothyreose als auch zu einer Autoimmunthyreoiditis führen kann.

Auffällig bei allen drei Patienten war, dass das 5mC nicht ausschließlich an CpG-Dinukleotiden auftrat. Über die Methylierung an C-Residuen außerhalb der CpG-Dinukleotide in Säugetieren ist bislang kaum etwas bekannt. In pflanzlichen Genomen ist die Existenz von 5-Methylcytosin neben CpG-Dinukleotiden an CpNpG-Trinukleotiden schon länger etabliert. N kann dabei durch jede der 4 Basen repräsentiert werden (Gruenbaum et al. 1981). Die meisten systematischen enzymatischen Studien beim Menschen und Säugetier konzentrieren sich ausschließlich auf die CpG-Methylierung. In zwei Arbeiten konnte eine DNA-Methylierung an symmetrischen CpNpGs (Clark et al. 1995) und asymmetrischen CpNs nachgewiesen werden (Tasheva et al. 1994; Woodcock et al. 1987). Auch in der Arbeit zur Wildtypmethylierung der Maus von *Pax3* und *Pax7* wurden CpNpGs im Bereich der Homöodomäne bei *Pax7* beobachtet (Kay et al. 1997). Die Rolle der verschiedenen Typen von DNA-Methylierung außerhalb der CpG-Dinukleotide ist bislang unklar. Einerseits könnte es sich um einen randomisierten und nicht-spezifischen Effekt handeln andererseits ist auch vorstellbar, dass den verschiedenen Typen von DNA-

Methylierung definierte Rollen zugesprochen werden können. Für Letzteres spräche die Diskussion bei chinesischen Hamsterzellen über einen möglichen Zusammenhang zwischen Chromosomen-Replikation und stark methylierten DNA-Inseln, die nicht auf CpG-Dinukleotide zurückzuführen sind (Tasheva et al. 1994).

Auch wenn eine Methylierung im Säugetier außerhalb der CpG-Dinukleotide beschrieben worden ist, mußte in der hier vorliegenden Arbeit die Möglichkeit eines technischen Artefaktes berücksichtigt werden. Gegen solch einen Artefakt sprach zunächst die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie das heterogene Muster der ausgewerteten Klone. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden die auffälligen Proben neben dem nach Hajkova et al. durchgeführten Bisulfit-Protokoll zusätzlich mit dem Bisulfit-Protokoll nach Zeschnigk et al. untersucht. Bei letzterem Protokoll zeigten sich sowohl in der Direktsequenzierung als auch nach Einklonierung mit dem Wildtyp vergleichbare hypomethylierte Sequenzen.

### **5.3.3 Diskussion der Methode**

Die Sequenzierung Bisulfit-umgewandelter DNA ist Methode der Wahl, um die Methylierung von CpGs in einem bestimmten Sequenzabschnitt erfassen zu können. Die Methode basiert auf der selektiven Deaminierung von nicht methyliertem Cytosin zu Uracil wohingegen 5mC als Cytosin erhalten bleibt. Durch die Einklonierung wird es möglich, die Methylierung singulärer Moleküle zu bestimmen. Sollte sich ein unmethyliertes Cytosin der Bisulfitumwandlung entziehen, so erscheint es in der Sequenz ebenfalls als Cytosin, unabhängig davon an welcher Position es sich in der Sequenz befindet. Dafür gibt es verschiedene Gründe. Erster entscheidender Schritt ist eine vollständige Denaturierung der DNA, da die Bisulfitreaktion nur an einzelsträngiger DNA durchgeführt werden kann. Beide Protokolle denaturieren sowohl mittels Hitze als auch alkalisch. Vorteil des Protokolls von Hajkova et al., das von dem Protokoll nach Olek et al. abstammt, ist, dass die DNA unmittelbar nach der Denaturierung in eine LMP-Agarose eingebettet wird und damit vor einer Renaturierung aufgrund der physikalischen Trennung der DNA-Stränge geschützt wird. Phänomene nicht umgewandelter DNA sind von Olek et al. nicht beobachtet worden. Zum anderen spielt die Inkubationszeit und Temperatur während der Bisulfitbehandlung eine entscheidende Rolle. Laut Grunau et al. werden die besten Umwandlungsergebnisse der DNA um die 50°C nach 4 (99,48±0,39%) bis 10 Stunden (99,65±0,52%) erreicht (Grunau et al. 2001). Das Protokoll von Hajkova et al erfolgt bei einer Inkubationszeit von 5 Stunden

bei 50°C, die Inkubation nach dem Protokoll von Zeschnigk et al. läuft bei gleicher Temperatur über 20 Stunden bei jedoch wesentlich höherer Ausgangsmenge an DNA, so dass beide Protokolle die empfohlene Inkubationszeit und –temperatur gut erfüllen.

Ein entscheidender Unterschied beider Protokolle ist die Menge der eingesetzten DNA. Daten von Grunau et al. deuten daraufhin, dass 84-96% der DNA während der Bisulfitbehandlung degradiert. Damit die verbleibende DNA-Menge für die anschließende PCR ausreicht, werden in den klassischen Bisulfit-Protokollen wie das nach Zeschnigk et al. relativ große Mengen an DNA eingesetzt. Ziel der Entwicklung des Protokolls nach Olek et al. (Olek et al. 1996) war es vor allem, die DNA durch Einbettung in die LMP-Agarose vor dieser Degradierung zu schützen, um auch kleinere Mengen an DNA untersuchen zu können. Die Degradierung der DNA steigt mit der Zeit, so dass auch dies eher einen Vorteil des Protokolls nach Hajkova et al. mit der deutlich kürzeren Inkubationszeit darstellt.

Im Vergleich der beiden Methoden lassen sich demnach keine Erklärungen für die diskrepanten Ergebnisse der unterschiedlich benutzten Protokolle finden. Alle anderen Parameter, die die Ergebnisse hätten beeinflussen können wie die Auswahl der Primer oder die Frische der zubereiteten NaOH-Lösungen waren in beiden Protokollen identisch. Die Wiederholung der Versuche derselben DNA und dessen Reproduzierbarkeit sowie Vergleichs-PCRs vieler anderer Probanden und Patienten lassen nicht auf die von einigen Autoren beobachtete Präferenz und Selektion bestimmter methylierter oder unmethylierter Fragmente in der PCR schließen (Grunau et al. 2001; Warnecke et al. 1997).

Auch die von Grunau et al. beschriebene Möglichkeit der Bevorzugung von methylierten Fragmenten während der Einklonierung in einen Vektor konnte durch eine Methylierungs-spezifische PCR widerlegt werden. Diese zeigte, dass eine deutliche Fraktion in der PCR der auffälligen Proben methyliert vorlag. Ebenso konnte zu keinem Zeitpunkt der Arbeit die Bevorzugung eines Allels oder ein diskrepantes Ergebnis zwischen Direktsequenzierung und Sequenzierung von einklonierten Proben gesehen werden. Dies spricht insgesamt für eine gute Repräsentanz der Ergebnisse und gegen eine Selektion.

Einzigster greifbarer Unterschied der Versuche liegt in der verwendeten DNA, die in beiden Protokollen nicht aus der gleichen Extraktion stammte. Da für das Protokoll nach

Zeschnick et al. eine größere DNA-Menge erforderlich war, erfolgte eine erneute Blutentnahme und DNA-Extraktion, deren Untersuchung unauffällige hypomethylierte Sequenzen zeigte. Aus diesem Grund erfolgte ein neuer Versuchsansatz nach Hajkova et al. mit den neu extrahierten DNA-Proben. In dieser Wiederholung stellten sich alle untersuchten Proben, die zuvor hypermethyliert waren, entsprechend der Wildtyp-Methylierung hypomethyliert dar. Dies verstärkt die Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen der DNA-Aufarbeitung und der diskrepanten Ergebnisse bestehen könnte. So ist vorstellbar, dass bestimmte Substanzen, die zur Aufbereitung der DNA benötigt werden, eine Denaturierung oder Bisulfitumwandlung der DNA erschweren. Ähnliche Beobachtungen sind bislang nicht publiziert worden.

Zusammenfassend ist es demnach nicht gelungen, Veränderungen im Methylierungsmuster bei Patienten mit konnataler Hypothyreose und den diskordanten Zwillingspaaren in den LZ zu identifizieren. Ein organspezifischer Methylierungsdefekt in der Schilddrüse im Bereich des *PAX8* lässt sich jedoch nicht ausschliessen.

#### **5.4 Entwicklung weiterer Hypothesen für die Pathogenese der CH:**

Ein genetischer Hintergrund für die Entstehung der konnatalen Hypothyreose konnte durch verschiedene Arbeiten belegt werden. Gegenüber der weltweiten Inzidenz mit 1 zu 3-4000 Neugeborenen konnte eine geringere Inzidenz bei der afro-amerikanischen Bevölkerungsgruppe sowie eine erhöhte Inzidenz bei einer Bevölkerungsgruppe mittelamerikanischen Ursprungs (Hispanics) gezeigt werden (Grant et al. 1988; Knobel et al. 2003; Lorey et al. 1992). 2% der betroffenen Patienten mit konnataler Hypothyreose haben einen ebenfalls betroffenen Verwandten. Dies entspricht einer 15fachen Steigerung der Erkrankungswahrscheinlichkeit gegenüber der Normalbevölkerung (Castanet et al. 2001).

Die meisten Daten sprechen jedoch gegen eine klassische Vererbung nach Mendel, darunter vor allem das überwiegend sporadische Auftreten der Erkrankung sowie die Diskordanz monozygoter Zwillinge. Dennoch ist klar gezeigt worden, dass Mutationen in Genen, die an der Entwicklung der SD beteiligt sind, in Mausmodellen zu einer SD-Dysgenese führen und dass Mutationen in diesen Genen beim Menschen ebenfalls zu einer SD-Dysgenese führen können.

Auch nach negativen Ergebnissen in der Untersuchung des *PAX8*-Gens ist es am ehesten vorstellbar, dass die Funktion der gleichen Gene sowohl durch klassische

Mutationen als auch durch epigenetische Mechanismen beeinträchtigt werden kann, wobei nur im ersten Fall die Möglichkeit einer Weitervererbung gegeben ist.

#### **5.4.1 DNA-Methylierung in anderen Kandidatengen**

Die Suche nach neuen Kandidatengen, die zu einem selektiven Schilddrüsenphänotyp führen, scheint der plansicherste nächste Schritt zu sein. Die Tatsache, dass die ersten Differenzierungsstadien während der Schilddrüsenentwicklung in den Knock-out-Mausmodellen von *Nkx2.1*, *Foxe-1* oder *Pax8* normal sind, legt die Annahme nahe, dass weitere Gene bereits vor diesen drei Transkriptionsfaktoren an der Schilddrüsenentwicklung beteiligt sein müssen. Am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass *Hex1* für eine normale Expression von *Nkx2.1* und *Foxe-1* benötigt wird. Jedoch konnte auch in der *Hex1* <sup>-/-</sup> Maus bereits vor dem Stadium E9 das Vorhandensein eines Schilddrüsenprimordiums gezeigt werden (Martinez Barbera et al. 2000). In anderen Knock-out-Maus-Modellen werden leichtere Schilddrüsenbeteiligungen gefunden wie z.B. bei der *Hox3a* <sup>-/-</sup> Maus oder der *Eya* <sup>-/-</sup> Maus (Manley et al. 1995; Xu et al. 2002). Weitere Gene, die nach *FOXE-1* angeschaltet werden, sind zur Zeit in Untersuchung (De Felice et al. 1998).

Die Identifikation dieser postulierten weiteren Gene der frühen Schilddrüsenentwicklung steht daher im Vordergrund der weiteren Arbeiten. Im Anschluß sollte die Suche nach klassischen Mutationen sowie Methylierungsdefekten in den neu identifizierten Genen erfolgen. Auch eine genomweite Suche nach Methylierungsunterschieden z.B. bei diskordanten Zwillingen mit konnataler Hypothyreose wäre in Zukunft vorstellbar.

#### **5.4.2 Histonmodifikation**

Neben der DNA-Methylierung, die eine unmittelbare chemische Veränderung der DNA zur Folge hat, findet der zweite Hauptfaktor der epigenetischen Kontrolle auf Histonebene statt. Histone sind Proteine, die an der Verdichtung des Chromatin beteiligt sind.

Die Veränderung der Histone ist ein ähnlich dynamisches System wie das der DNA-Methylierung, das während der Entwicklung starken Schwankungen unterliegt, durch spezifische Enzyme reguliert wird und Unterschiede in verschiedenen Geweben aufweisen kann (Jenuwein et al. 2001; Richards et al. 2002; Turner 2000). Dabei ist die Histonacetylierung häufig assoziiert mit einer aktiven Chromatinstruktur (Euchromatin) und transkriptioneller Aktivität wohingegen die Histon-Methylierung häufig mit einer

Komprimierung des Chromatins und dem Verlust der Genexpression einhergeht. So ist beispielsweise die Acetylierung von Histon H3 am Lysine 9 (H3K9) mit dem aktiven Zustand assoziiert, wohingegen die Methylierung von H3K9 mit dem transkriptionell inaktiven Zustand gekoppelt ist (Horsthemke 2006). Es gibt viele Ausnahmen und das System ist sehr komplex, jedoch konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Komponenten des epigenetischen Systems sehr eng miteinander verbunden sind (Tamaru et al. 2001).

Eine Veränderung der Histone im *PAX8*-Gen oder einem anderen Kandidatengen ist für die CH als pathogenetischer Faktor ebenfalls denkbar, die mittels CHIP-Analyse (Chromatin-Immunoprecipitation) nachgewiesen werden könnte. Der CHIP-Essay erlaubt die Analyse von Chromatinveränderungen und der damit in Verbindung stehenden Bindungsfaktoren.

Bei der Okulo-Aurikulo-Vertebralen Dysplasie (Goldenhar-Symptomenkomplex) konnte kürzlich ein Zusammenhang zwischen Histonacetylierung und veränderter Allelexpression gezeigt werden (Fischer et al. 2006). Dieses Krankheitsbild zeigt ähnliche epidemiologische Hintergründe wie die CH: Das Krankheitsbild zeigt eine hohe Phänotypenvariabilität, es tritt vorwiegend sporadisch auf und nur wenige familiäre Fälle sowie eine Diskordanz bei monozygoten Zwillingen sind in der Literatur beschrieben worden.

#### **5.4.3 Somatische Mutation**

Somatische Mutationen in den frühen Stadien der SD-Entwicklung in den oben beschriebenen Kandidaten-Genen sowie in bislang noch unbekannt Genen könnten ebenfalls die Organogenese der Schilddrüse beeinflussen. Eine somatische Mutation könnte ein sporadisches Auftreten der Erkrankung und, wenn sie nach dem Zeitpunkt der Teilung von Zwillingen aufträte, die Diskordanz von monozygoten Zwillingen erklären. Jedoch wird der Anteil somatischer Mutationen weitaus geringer eingeschätzt als der Einfluß epigenetischer Modifikationen (Bennett-Baker et al. 2003).

## 6 Zusammenfassung

Die primäre konnatale Hypothyreose ist der häufigste angeborene Defekt des endokrinen Systems und tritt mit einer Inzidenz von 1:3-4000 Neugeborenen auf. Umfangreiche epidemiologische Daten zeigen weltweit bis auf wenige Ausnahmen eine gleich hohe Inzidenz in unterschiedlichen Populationen. Aus ätiologischer Sicht bilden die Schilddrüsendysgenesien wie Athyreose, Hypoplasie, Ektopie und Hemithyroidea mit 75-85% die größte Gruppe der konnatalen Hypothyreosen und lassen sich auf einen frühen Entwicklungsdefekt zurückführen. Sie treten überwiegend sporadisch auf, nur wenige familiäre Fälle sind beschrieben worden. Monozygote Zwillinge erweisen sich in der Mehrzahl der Fälle hinsichtlich ihrer Erkrankung als diskordant. In Mausmodellen konnten bislang vier Kandidatengene, die in der frühen Entwicklung der Schilddrüse eine Rolle spielen, identifiziert werden: *Pax8*, *FOXE-1*, *Nkx2.1* und *Hex1*. Mutationen in den ersten drei Kandidaten-Genen konnten beim Menschen einige Fälle der konnatalen Hypothyreose klären, die Pathogenese der meisten Fälle bleibt aber weiterhin unklar.

Die vorliegende Arbeit hat die Hypothese eines epigenetischen Fehlers als möglichen postzygotischen Mechanismus, der das sporadische Vorkommen der konnatalen Hypothyreose sowie die Diskordanz monozygoter Zwillinge erklären könnte, verfolgt. Untersucht wurde die DNA-Methylierung anhand von Blutleukozyten-DNA bei Patienten mit konnataler Hypothyreose sowie bei 5 diskordanten Zwillingspaaren im *PAX8*-Gen als dem bisher einzig bekannten Transkriptionsfaktor, bei dem Mutationen zu einer isolierten konnatalen Hypothyreose führen können. Dabei wurde die Hypothese verfolgt, ob Veränderungen in der DNA-Methylierung des *PAX8*-Gens vergleichbar einer *PAX8*-Funktionsverlust-Mutation zu der Entstehung einer konnatalen Hypothyreose führen können.

Zunächst wurde das Methylierungsmuster der zu untersuchenden Bereiche in DNA gesunder Probanden mittels Bisulfitbehandlung ermittelt. Im Bereich des *PAX8*-Gens wurden beim Menschen drei CpG-Inseln identifiziert, von denen zwei aufgrund ihrer Position als putativer Enhancer oder Promotor angesehen werden können und sich im Mausgenom in vergleichbarer Weise methyliert ebenfalls darstellen ließen. Der putative Enhancer-Bereich (hCpG-1) stellte sich bei allen untersuchten gesunden Probanden in verschiedenen Geweben hypomethyliert dar. Der putative Promotorbereich (hCpG1) zeigte eine schilddrüsenspezifische Hypomethylierung im 5'-Bereich (hCpG1.1) und im

3´-Bereich (hCpG1.3) eine Hypomethylierung in allen untersuchten Geweben. Aufgrund dieser etablierten Methylierungsmuster des *PAX8*-Gens ließen sich Methylierungsdefekte, die erstens gewebeunspezifisch die hypomethylierten Bereiche hCpG-1 und hCpG1.3 sowie zweitens schilddrüsenspezifisch den Bereich hCpG1.1 betreffen, darstellen. In den zur Verfügung stehenden DNA-Proben aus Blutleukozyten konnten nur die postulierten Defekte der Amplikons hCpG-1 bis hCpG1.3 untersucht werden. Bei den Patienten mit Schilddrüsenfehlbildungen zeigten sich keinerlei Abweichungen im Bereich hCpG-1 sowie im 5´-Bereich der hCpG1.1. Zunächst auffällige hypermethylierte Muster im 3´-Bereich der hCpG1 bei 3 Patienten ließen sich mit einer zweiten Methode nicht bestätigen, so dass am ehesten von einem technischen Artefakt ausgegangen werden muß. Auch in der Gruppe der diskordanten Zwillinge mit konnataler Hypothyreose ließen sich in allen untersuchten Fragmenten keine Unterschiede zwischen erkrankten Zwillingen, gesunden Zwillingen und Kontrollpersonen nachweisen.

Schlußfolgernd ließ sich demnach kein Unterschied in der DNA-Methylierung der Blutleukozyten-DNA der an Schilddrüsenfehlbildungen erkrankten Patienten und Kontrollpersonen darstellen. Die Möglichkeit einer schilddrüsenspezifischen Hypermethylierung im 5´-Bereich des putativen Promotors (hCpG1.1) ließ sich nicht ausschließen, da von den Patienten ausschließlich Blutleukozyten-DNA zur Verfügung stand. Ein solcher gewebespezifischer Defekt ließe sich nur dann nachweisen, wenn man beispielsweise mittels Feinnadelbiopsie genügend Schilddrüsenmaterial gewinnen könnte. Dies wird bei der häufig fehlenden oder stark hypoplastischen Schilddrüse der betroffenen Patienten und aus ethischen Fragen schwierig zu realisieren sein. Als weitere Hypothese für die Entstehung der Schilddrüsenfehlbildungen und insbesondere der konnatalen Hypothyreose könnte eine fehlerhafte DNA-Methylierung in einem der anderen für die Entstehung der Schilddrüsendysgenese bekannten oder unbekanntem Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle spielen. Auch andere epigenetische Defekte zum Beispiel der Histon-Modifizierung könnten eine pathogenetische Rolle spielen. Letztendlich kommen aber auch frühe somatische Mutationen während der Embryogenese als weiterer postzygotischer Prozeß für die Pathogenese der konnatalen Hypothyreose in Betracht. Auch diese ließen sich nur in Schilddrüsenewebe nachweisen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ambrugger P, Stoeva I, Biebermann H, Torresani T, Leitner C, Grüters A. Novel mutations of the thyroid peroxidase gene in patients with permanent congenital hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* **2001**;145(1):19-24.
- Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**;90(24):11995-9.
- Barbour VM, Tufarelli C, Sharpe JA, et al. alpha-thalassemia resulting from a negative chromosomal position effect. *Blood* **2000**;96(3):800-7.
- Bell AC, Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* **2000**;405(6785):482-5.
- Bennett-Baker PE, Wilkowski J, Burke DT. Age-associated activation of epigenetically repressed genes in the mouse. *Genetics* **2003**;165(4):2055-62.
- Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* **2000**;9(16):2395-402.
- Bikker H, Vulsma T, Baas F, de Vijlder JJ. Identification of five novel inactivating mutations in the human thyroid peroxidase gene by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mutat* **1995**;6(1):9-16.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **2002**;16(1):6-21.
- Bird AP, Taggart MH, Nicholls RD, Higgs DR. Non-methylated CpG-rich islands at the human alpha-globin locus: implications for evolution of the alpha-globin pseudogene. *Embo J* **1987**;6(4):999-1004.
- Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* **1999**;99(5):451-4.
- Brown KW, Villar AJ, Bickmore W, et al. Imprinting mutation in the Beckwith-Wiedemann syndrome leads to biallelic IGF2 expression through an H19-independent pathway. *Hum Mol Genet* **1996**;5(12):2027-32.
- Burch GH, Bedolli MA, McDonough S, Rosenthal SM, Bristow J. Embryonic expression of tenascin-X suggests a role in limb, muscle, and heart development. *Dev Dyn* **1995**;203(4):491-504.
- Castanet M, Park SM, Smith A, et al. A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate. *Hum Mol Genet* **2002**;11(17):2051-9.
- Castanet M, Polak M, Bonaiti-Pellie C, Lyonnet S, Czernichow P, Leger J. Nineteen years of national screening for congenital hypothyroidism: familial cases with thyroid dysgenesis suggest the involvement of genetic factors. *J Clin Endocrinol Metab* **2001**;86(5):2009-14.

- Chanoine JP, Bourdoux P, Delange F. Congenital anomalies associated with hypothyroidism. *Arch Dis Child* **1986**;61(11):1147.
- Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* **1998**;395(6697):89-93.
- Clark SJ, Harrison J, Frommer M. CpNpG methylation in mammalian cells. *Nat Genet* **1995**;10(1):20-7.
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* **1994**;22(15):2990-7.
- Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heinz P, et al. Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat Genet* **1998**;19(4):399-401.
- Congdon T, Nguyen LQ, Nogueira CR, Habiby RL, Medeiros-Neto G, Kopp P. A novel mutation (Q40P) in PAX8 associated with congenital hypothyroidism and thyroid hypoplasia: evidence for phenotypic variability in mother and child. *J Clin Endocrinol Metab* **2001**;86(8):3962-7.
- Cuadrado M, Sacristan M, Antequera F. Species-specific organization of CpG island promoters at mammalian homologous genes. *EMBO Rep* **2001**;2(7):586-92.
- Damante G, Di Lauro R. Thyroid-specific gene expression. *Biochim Biophys Acta* **1994**;1218(3):255-66.
- De Felice M, Ovitt C, Biffali E, et al. A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat Genet* **1998**;19(4):395-8.
- Dean W, Santos F, Stojkovic M, et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**;98(24):13734-8.
- Deladoey J, Belanger N, Van Vliet G. Random variability in congenital hypothyroidism from thyroid dysgenesis over 16 years in Quebec. *J Clin Endocrinol Metab* **2007**;92(8):3158-61.
- Devos H, Rodd C, Gagne N, Laframboise R, Van Vliet G. A search for the possible molecular mechanisms of thyroid dysgenesis: sex ratios and associated malformations. *J Clin Endocrinol Metab* **1999**;84(7):2502-6.
- Djemli A, Van Vliet G, Delvin EE. Congenital hypothyroidism: from paracelsus to molecular diagnosis. *Clin Biochem* **2006**;39(5):511-8.
- Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet* **2006**;38(12):1378-85.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **2004**;429(6990):457-63.

- Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* **1982**;10(8):2709-21.
- Feil R, Walter J, Allen ND, Reik W. Developmental control of allelic methylation in the imprinted mouse *Igf2* and *H19* genes. *Development* **1994**;120(10):2933-43.
- Fernhoff PM, Brown AL, Elsas LJ. Congenital hypothyroidism: increased risk of neonatal morbidity results in delayed treatment. *Lancet* **1987**;1(8531):490-1.
- Fischer S, Ludecke HJ, Wieczorek D, Bohringer S, Gillessen-Kaesbach G, Horsthemke B. Histone acetylation dependent allelic expression imbalance of *BAPX1* in patients with the oculo-auriculo-vertebral spectrum. *Hum Mol Genet* **2006**;15(4):581-7.
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**;102(30):10604-9.
- Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* **1987**;196(2):261-82.
- Glenn CC, Nicholls RD, Robinson WP, et al. Modification of 15q11-q13 DNA methylation imprints in unique Angelman and Prader-Willi patients. *Hum Mol Genet* **1993**;2(9):1377-82.
- Goto T, Monk M. Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. *Microbiol Mol Biol Rev* **1998**;62(2):362-78.
- Grant DB, Smith I. Survey of neonatal screening for primary hypothyroidism in England, Wales, and Northern Ireland 1982-4. *Br Med J (Clin Res Ed)* **1988**;296(6633):1355-8.
- Grasberger H, Ringkananont U, Lefrancois P, Abramowicz M, Vassart G, Refetoff S. Thyroid transcription factor 1 rescues *PAX8/p300* synergism impaired by a natural *PAX8* paired domain mutation with dominant negative activity. *Mol Endocrinol* **2005**;19(7):1779-91.
- Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet* **1989**;83(2):155-8.
- Gringras P, Chen W. Mechanisms for differences in monozygous twins. *Early Hum Dev* **2001**;64(2):105-17.
- Gruenbaum Y, Naveh-Many T, Cedar H, Razin A. Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature* **1981**;292(5826):860-2.
- Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res* **2001**;29(13):E65-5.

- Grüters A, Biebermann H, Krude H. Neonatal thyroid disorders. *Horm Res* **2003**;59 Suppl 1:24-9.
- Grüters A, Jenner A, Krude H. Long-term consequences of congenital hypothyroidism in the era of screening programmes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **2002**;16(2):369-82.
- Grüters A, Krude H. Update on the management of congenital hypothyroidism. *Horm Res* **2007**;68 Suppl 5:107-11.
- Grüters A, Krude H, Biebermann H. Molecular genetic defects in congenital hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* **2004**;151 Suppl 3:U39-44.
- Grüters A, Liesenkotter KP, Zapico M, et al. Results of the screening program for congenital hypothyroidism in Berlin (1978-1995). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **1997**;105 Suppl 4:28-31.
- Hajkova P, el-Maarri O, Engemann S, Oswald J, Olek A, Walter J. DNA-methylation analysis by the bisulfite-assisted genomic sequencing method. *Methods Mol Biol* **2002**;200:143-54.
- Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, et al. The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**;96(25):14412-7.
- Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM, Tilghman SM. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* **2000**;405(6785):486-9.
- Horsthemke B. Epimutations in human disease. *Curr Top Microbiol Immunol* **2006**;310:45-59.
- Ieiri T, Cochaux P, Targovnik HM, et al. A 3' splice site mutation in the thyroglobulin gene responsible for congenital goiter with hypothyroidism. *J Clin Invest* **1991**;88(6):1901-5.
- Issa JP. CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* **2000**;249:101-18.
- Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, et al. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* **2004**;103(5):1635-40.
- Jeltsch A. Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem* **2002**;3(4):274-93.
- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* **2001**;293(5532):1074-80.
- Jorgensen AL, Philip J, Raskind WH, et al. Different patterns of X inactivation in MZ twins discordant for red-green color-vision deficiency. *Am J Hum Genet* **1992**;51(2):291-8.

- Kantor B, Makedonski K, Green-Finberg Y, Shemer R, Razin A. Control elements within the PWS/AS imprinting box and their function in the imprinting process. *Hum Mol Genet* **2004**;13(7):751-62.
- Kay PH, Harmon D, Fletcher S, Ziman M, Jacobsen PF, Papadimitriou JM. Variation in the methylation profile and structure of Pax3 and Pax7 among different mouse strains and during expression. *Gene* **1997**;184(1):45-53.
- Kimura S, Hara Y, Pineau T, et al. The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev* **1996**;10(1):60-9.
- Knobel M, Medeiros-Neto G. An outline of inherited disorders of the thyroid hormone generating system. *Thyroid* **2003**;13(8):771-801.
- Kriaucionis S, Bird A. DNA methylation and Rett syndrome. *Hum Mol Genet* **2003**;12 Spec No 2:R221-7.
- Krude H, Schutz B, Biebermann H, et al. Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency. *J Clin Invest* **2002**;109(4):475-80.
- Kruyer H, Mila M, Glover G, Carbonell P, Ballesta F, Estivill X. Fragile X syndrome and the (CGG)<sub>n</sub> mutation: two families with discordant MZ twins. *Am J Hum Genet* **1994**;54(3):437-42.
- Kurosawa K, Kuromaru R, Imaizumi K, et al. Monozygotic twins with discordant sex. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* **1992**;41(4):301-10.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **2001**;409(6822):860-921.
- Lapi P, Macchia PE, Chiovato L, et al. Mutations in the gene encoding thyroid transcription factor-1 (TTF-1) are not a frequent cause of congenital hypothyroidism (CH) with thyroid dysgenesis. *Thyroid* **1997**;7(3):383-7.
- Lee MP, DeBaun M, Randhawa G, Reichard BA, Elledge SJ, Feinberg AP. Low frequency of p57KIP2 mutation in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Hum Genet* **1997**;61(2):304-9.
- Levy O, Ginter CS, De la Vieja A, Levy D, Carrasco N. Identification of a structural requirement for thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS) function from analysis of a mutation that causes human congenital hypothyroidism. *FEBS Lett* **1998**;429(1):36-40.
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **1992**;69(6):915-26.
- Lorey FW, Cunningham GC. Birth prevalence of primary congenital hypothyroidism by sex and ethnicity. *Hum Biol* **1992**;64(4):531-8.

- Macchia PE, Lapi P, Krude H, et al. PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nat Genet* **1998**;19(1):83-6.
- Macchia PE, Mattei MG, Lapi P, Fenzi G, Di Lauro R. Cloning, chromosomal localization and identification of polymorphisms in the human thyroid transcription factor 2 gene (TTF2). *Biochimie* **1999**;81(5):433-40.
- Macleod D, Ali RR, Bird A. An alternative promoter in the mouse major histocompatibility complex class II I-Abeta gene: implications for the origin of CpG islands. *Mol Cell Biol* **1998**;18(8):4433-43.
- Manley NR, Capecchi MR. The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid development. *Development* **1995**;121(7):1989-2003.
- Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P. Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet* **1998**;19(1):87-90.
- Martinez Barbera JP, Clements M, Thomas P, et al. The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development* **2000**;127(11):2433-45.
- McLean R, Howard N, Murray IP. Thyroid dysgenesis in monozygotic twins: variants identified by scintigraphy. *Eur J Nucl Med* **1985**;10(7-8):346-8.
- Meeus L, Gilbert B, Rydlewski C, et al. Characterization of a novel loss of function mutation of PAX8 in a familial case of congenital hypothyroidism with in-place, normal-sized thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* **2004**;89(9):4285-91.
- Nakao M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* **2001**;278(1-2):25-31.
- Nicholls RD, Knepper JL. Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2001**;2:153-75.
- Oates NA, van Vliet J, Duffy DL, et al. Increased DNA methylation at the AXIN1 gene in a monozygotic twin from a pair discordant for a caudal duplication anomaly. *Am J Hum Genet* **2006**;79(1):155-62.
- Oberle I, Rousseau F, Heitz D, et al. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* **1991**;252(5010):1097-102.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **1999**;99(3):247-57.
- Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res* **1996**;24(24):5064-6.
- Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA. Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acids Res* **1998**;26(21):5009-10.

- Perry R, Heinrichs C, Bourdoux P, et al. Discordance of monozygotic twins for thyroid dysgenesis: implications for screening and for molecular pathophysiology. *J Clin Endocrinol Metab* **2002**;87(9):4072-7.
- Petronis A. Epigenetics and twins: three variations on the theme. *Trends Genet* **2006**;22(7):347-50.
- Plachov D, Chowdhury K, Walther C, Simon D, Guenet JL, Gruss P. Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development* **1990**;110(2):643-51.
- Pradhan S, Kim GD. The retinoblastoma gene product interacts with maintenance human DNA (cytosine-5) methyltransferase and modulates its activity. *Embo J* **2002**;21(4):779-88.
- Raizis AM, Schmitt F, Jost JP. A bisulfite method of 5-methylcytosine mapping that minimizes template degradation. *Anal Biochem* **1995**;226(1):161-6.
- Rakyan VK, Hildmann T, Novik KL, et al. DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: a pilot study for the human epigenome project. *PLoS Biol* **2004**;2(12):e405.
- Reid LH, Davies C, Cooper PR, et al. A 1-Mb physical map and PAC contig of the imprinted domain in 11p15.5 that contains TAPA1 and the BWSCR1/WT2 region. *Genomics* **1997**;43(3):366-75.
- Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **2001**;293(5532):1089-93.
- Reis A, Dittrich B, Greger V, et al. Imprinting mutations suggested by abnormal DNA methylation patterns in familial Angelman and Prader-Willi syndromes. *Am J Hum Genet* **1994**;54(5):741-7.
- Richards EJ, Elgin SC. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* **2002**;108(4):489-500.
- Roberts HE, Moore CA, Fernhoff PM, Brown AL, Khoury MJ. Population study of congenital hypothyroidism and associated birth defects, Atlanta, 1979-1992. *Am J Med Genet* **1997**;71(1):29-32.
- Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* **2000**;25(3):338-42.
- Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* **2000**;25(3):269-77.
- Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: A Laboratory Manual: CSHL Press; **2001**.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**;74(12):5463-7.

- Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* **2002**;241(1):172-82.
- Schwartz S, Zhang Z, Frazer KA, et al. PipMaker--a web server for aligning two genomic DNA sequences. *Genome Res* **2000**;10(4):577-86.
- Siebner R, Merlob P, Kaiserman I, Sack J. Congenital anomalies concomitant with persistent primary congenital hypothyroidism. *Am J Med Genet* **1992**;44(1):57-60.
- Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood* **1999**;93(12):4059-70.
- Singh SM, Murphy B, O'Reilly R. Epigenetic contributors to the discordance of monozygotic twins. *Clin Genet* **2002**;62(2):97-103.
- Sleutels F, Zwart R, Barlow DP. The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature* **2002**;415(6873):810-3.
- Song F, Smith JF, Kimura MT, et al. Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**;102(9):3336-41.
- Suter CM, Martin DI, Ward RL. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet* **2004**;36(5):497-501.
- Tada M, Tada T, Lefebvre L, Barton SC, Surani MA. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *Embo J* **1997**;16(21):6510-20.
- Tamaru H, Selker EU. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* **2001**;414(6861):277-83.
- Tasheva ES, Roufa DJ. Densely methylated DNA islands in mammalian chromosomal replication origins. *Mol Cell Biol* **1994**;14(9):5636-44.
- Tiberio G. MZ female twins discordant for X-linked diseases: a review. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* **1994**;43(3-4):207-14.
- Tufarelli C, Stanley JA, Garrick D, et al. Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat Genet* **2003**;34(2):157-65.
- Turner BM. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* **2000**;22(9):836-45.
- van de Graaf SA, Ris-Stalpers C, Veenboer GJ, et al. A premature stopcodon in thyroglobulin messenger RNA results in familial goiter and moderate hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* **1999**;84(7):2537-42.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science* **2001**;291(5507):1304-51.

- Vilain C, Rydlewski C, Duprez L, et al. Autosomal dominant transmission of congenital thyroid hypoplasia due to loss-of-function mutation of PAX8. *J Clin Endocrinol Metab* **2001**;86(1):234-8.
- Walter J, Paulsen M. Imprinting and disease. *Semin Cell Dev Biol* **2003**;14(1):101-10.
- Wang RY, Gehrke CW, Ehrlich M. Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res* **1980**;8(20):4777-90.
- Warnecke PM, Stirzaker C, Melki JR, Millar DS, Paul CL, Clark SJ. Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucleic Acids Res* **1997**;25(21):4422-6.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **2002**;420(6915):520-62.
- Weksberg R, Shuman C, Caluseriu O, et al. Discordant KCNQ1OT1 imprinting in sets of monozygotic twins discordant for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet* **2002**;11(11):1317-25.
- Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science* **1999**;286(5439):481-6.
- Wong AH, Gottesman, II, Petronis A. Phenotypic differences in genetically identical organisms: the epigenetic perspective. *Hum Mol Genet* **2005**;14 Spec No 1:R11-8.
- Woodcock DM, Crowther PJ, Diver WP. The majority of methylated deoxycytidines in human DNA are not in the CpG dinucleotide. *Biochem Biophys Res Commun* **1987**;145(2):888-94.
- Wutz A, Smrzka OW, Schweifer N, Schellander K, Wagner EF, Barlow DP. Imprinted expression of the *Igf2r* gene depends on an intronic CpG island. *Nature* **1997**;389(6652):745-9.
- Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* **1999**;402(6758):187-91.
- Xu PX, Zheng W, Laclef C, et al. *Eya1* is required for the morphogenesis of mammalian thymus, parathyroid and thyroid. *Development* **2002**;129(13):3033-44.
- Yamada Y, Watanabe H, Miura F, et al. A comprehensive analysis of allelic methylation status of CpG islands on human chromosome 21q. *Genome Res* **2004**;14(2):247-66.
- Yoon B, Herman H, Hu B, et al. *Rasgrf1* imprinting is regulated by a CTCF-dependent methylation-sensitive enhancer blocker. *Mol Cell Biol* **2005**;25(24):11184-90.

- 
- Zannini M, Avantaggiato V, Biffali E, et al. TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *Embo J* **1997**;16(11):3185-97.
- Zeschnigk M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Doerfler W. Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Hum Mol Genet* **1997**;6(3):387-95.
- Zneimer SM, Schneider NR, Richards CS. In situ hybridization shows direct evidence of skewed X inactivation in one of monozygotic twin females manifesting Duchenne muscular dystrophy. *Am J Med Genet* **1993**;45(5):601-5.

## 8 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1 Monatliche Inzidenz von CH über 16 Jahre.....	1
Abb. 2 Schematische Darstellung der Entwicklung von Schilddrüsenfollikelzellen und chronologische Darstellung der Genexpression .....	5
Abb. 3 Beispiele von DNA-Methylierung und Transkriptionsverlust.....	10
Abb. 4 Reprogrammierung der DNA-Methylierung während der Keimzellreifung (a) und der Embryonalentwicklung (b) (modifiziert nach Reik et al. 2001).....	11
Abb. 5 Biochemie der Bisulfitreaktion: .....	25
Abb. 6 Bisulfitumwandlung auf Sequenzebene .....	27
Abb. 7 Herstellung von DNA-Agarosekügelchen .....	27
Abb. 8 Position der Fragmente hCp1.1, hCpG1.2, hpG1.3, hCpG2.1, hCpG2.2 .....	30
Abb. 9 Position der Fragmente mCpG1.1, mCpG1.2, mCpG2 .....	31
Abb. 10 Optimierung der PCR: .....	32
Abb. 11 Kolonie-PCR; .....	35
Abb. 12 PipMaker-Analyse des <i>Pax8</i> . .....	37
Abb. 13 Nomenklatur der untersuchten Fragmente (Mensch).....	38
Abb. 14 Nomenklatur der untersuchten Fragmente (Maus).....	38
Abb. 15 Sequenzvergleich einer PCR Bisulfitumgewandelter DNA.....	39
Abb. 16 hCpG-1/LZ. ....	40
Abb. 17 hCpG-1/Gewebevergleich. ....	42
Abb. 18 hCpG-1/Gewebevergleich. ....	42
Abb. 19 hCpG1.1/LZ.....	43
Abb. 20 hCpG1.1/Gewebevergleich .....	44
Abb. 21 hCpG1.1/Gewebevergleich. ....	44
Abb. 22 hCpG1.1/Gewebevergleich .....	45
Abb. 23 hCpG1.1/SD-Zellen .....	45
Abb. 24 hCpG1.2/LZ.....	46
Abb. 25 hCpG1.2/Gewebevergleich .....	46
Abb. 26 hCpG1.3/LZ.....	47
Abb. 27 hCpG1.3/LZ.....	47
Abb. 28 hCpG1.3/Gewebevergleich .....	48
Abb. 29 hCpG1.3/Gewebevergleich/DS .....	48
Abb. 30 hCpG2.2/LZ.....	49
Abb. 31 hCpG2.2/Gewebevergleich .....	50
Abb. 32 Überblick Methylierungsmuster <i>PAX8</i> (Bsp.) .....	51
Abb. 33 mCpG-1/Maus .....	52
Abb. 34 mCpG1.1/Maus/Klonierung .....	52
Abb. 35 mCpG1.2/Maus/Klonierung .....	53
Abb. 36 mCpG1.2/Maus/DS .....	53
Abb. 37 mCpG2/Maus/Klonierung .....	54
Abb. 38 hCpG-1/CH/SNP und DS .....	55
Abb. 39 hCpG-1/CH/Klonierung .....	55
Abb. 40 hCpG1.1/CH/Klonierung.....	55
Abb. 41 hCpG1.1/CH/DS.....	56
Abb. 42 hCpG1.2/CH/DS.....	56
Abb. 43 hCpG1.3/CH/SNP und DS .....	57
Abb. 44 hCpG1.3/CH.....	57
Abb. 45 hCpG1.3/Patienten.....	59

---

Abb. 46 Primerposition der MSPCR und Darstellung der singulären Cytosine hCpG1-3 .....	60
Abb. 47 MS-PCR .....	61
Abb. 48 hCpG1.3/ 536, 2298, AT .....	63
Abb. 49 Abb.hCpG1.3/ 536, 2298, AT; .....	63
Abb. 50 hCpG-1/Zwillinge/DS .....	64
Abb. 51 hCpG-1/Zwillinge/Klonierung .....	65
Abb. 52 hCpG1.1/Zwillinge/DS .....	65
Abb. 53 hCpG1.1/Zwillinge/Klonierung .....	66
Abb. 54 hCpG1.2/Zwillinge/DS .....	66
Abb. 55 hCpG1.2/Zwillinge/Klonierung .....	67
Abb. 56 hCpG1.3/Zwillinge/DS .....	67
Abb. 57 hCpG1.3/Zwillinge/Klonierung .....	69
Abb. 58 hCpG1.3/Zwillinge/WSH .....	69
Abb. 59 Methylierungsmuster im <i>PAX8</i> -Gen .....	74

## 9 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1 Diagnose der CH .....	3
Tabelle 2 Übersicht der untersuchten Zwillingspaare .....	22
Tabelle 3 SNPs.....	26
Tabelle 4 PCR- Parameter für die Fragmente nach Bisulfitumwandlung.....	33
Tabelle 5 Übersicht Wildtyp-Methylierung im Gewebevergleich .....	75

## 10 Abkürzungen

A	Adenin
AT	Autoimmunthyreoiditis
BP	Basenpaare
C	Cytosin
CH	Koninatale Hypothyreose
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleotide
EDTA	Ethylendinitrietetraessigsäure
Ex	Exon
Exo1	Exonuklease
G	Guanin
HEP	Humane Epigenom Project
LB-Medium	lysogeny-broth-Medium
LZ	periphere Blutleukozyten
5mC	5-Methylcytosin
MS	Mausschwanz
NIS	Natrium-Iodid-Symporter
Pax-Gen	paired-box-gen
PCR	Polymerasekettenreaktion
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SD	Schilddrüse
SDS	Natriumdodecylsulfonat
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
T	Thymin
T3	Thrijodthyronin
T4	Thyroxin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Buffer
TITF	Thyroid transcrption factor
TG	Thyreoglobulin
TPO	Thyreoperoxidase
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSH	Thyreotropin
TRH	Thyreotropin-Releasing-Hormon
US	Ultraschall
WSH	Wangenschleimhaut
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **Lebenslauf**

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

## Danksagung

Zuallererst möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich bedanken, die mir die Durchführung meiner Dissertation am Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie ermöglicht hat.

Mein Dank und tiefe Verbundenheit gilt Herrn Prof. Dr. Heiko Krude, der meine Laborarbeit von Anfang an betreut hat und der es geschafft hat, mich immer wieder für die Experimentelle Endokrinologie zu begeistern. Ich danke ihm für die hervorragende Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und für seine unerschöpflichen Ideen.

Besonderer Dank gilt auch Frau PD Dr. Heike Biebertmann, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie sei für die sehr freundliche Atmosphäre und Hilfsbereitschaft während der Entstehung dieser Arbeit gedankt, vor allem auch Rita Oeltjen für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Ganz herzlich möchte ich mich für unsere Kooperationen bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Horsthemke und Herrn Prof. Dr. Stefan Mundlos bedanken. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Jörn Walter für die Diskussionsbereitschaft zu Beginn der Arbeit.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie für die Unterstützung, ganz besonders meinem Mann Dr. Martin Stockmann als Kooperationspartner, Korrekturleser und unermüdlichem Computerspezialist.

## Publikationen und Abstracts

Haufs N, Krude H, Schwarz S, Wernig F, Frisch H, Grüters A. Screening for HESX1-gene mutations in patients with septo-optic dysplasia and midline defects. [abstract vFr083]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108: S45

Krude H, Haufs N, Frisch H, Schwarz S, Grüters A. Hormones may predict neurones: A clinical and genetic study on the cause and course of septo-optic dysplasia. [abstract P3-559] *Horm Res* 2000; 53:161

McNay DF, Turton JP, Kelbermann D, Woods KS, Brauner R, Papadimitriou A, Keller E, Keller A, Haufs N, Krude H, Shalet SM, Dattani MT. HESX1 mutations are an uncommon cause of septo-optic dysplasia and hypopituitarism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 ;92(2):691-7.

Alt B, Elsalini OA, Schrupf P, Haufs N, Lawson ND, Schwabe GC, Mundlos S, Grüters A, Krude H, Rohr KB. Arteries define the position of the thyroid gland during its developmental relocalisation. *Development.* 2006 ;133(19):3797-804.

## Erklärung

„Ich, Nele Haufs, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Analyse der CpG-Methylierung des *PAX8*-Gens bei Patienten mit Schilddrüsendysgenese selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift