

AUS DEM INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE PÄDIATRISCHE ENDOKRINOLOGIE  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT CHARITÉ – UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN

## **DISSERTATION**

# **MOLEKULARGENETISCHE UND MOLEKULARZUTOGENETISCHE ANALYSE DES NKX2.1 GENS BEI PATIENTEN MIT KONGENITALER HYPOTHYREOSE UND ASSOZIIERTER CHOREOATHETOSE**

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOCTOR MEDICINAE (DR. MED.)

VORGELEGT DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT CHARITÉ – UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN

VON

ANNE THORWARTH

AUS BRAUNSCHWEIG

DATUM DER PROMOTION: 05.12.2014

---

## **INHALTSVERZEICHNIS**

INHALTSVERZEICHNIS	2
I. ABSTRACT	3
II. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	5
III. AUSFÜHRLICHE ANTEILSERKLÄRUNG AN DER ERFOLGTEN PUBLIKATION	6
IV. AUSZUG AUS DER „JOURNAL SUMMARY LIST“	8
V. PUBLIKATION	9
VI. LEBENSLAUF	10
VII. PUBLIKATIONSLISTE	11
VIII. DANKSAGUNG	13

## I. ABSTRACT

Das *NKX2-1* Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle in der Organogenese von ZNS, Schilddrüse und Lunge spielt. Mutationen führen zu einer Malformation und damit Dysfunktion der entsprechenden Organe. Mit der vorliegenden Arbeit wurden im bisher größten kohärenten Kollektiv Patienten mit suspektem Phänotyp systematisch hinsichtlich Mutationsfrequenz und -qualität, sowie des phänotypischen Spektrums von *NKX2-1* Mutationen untersucht.

Mittels Sanger Sequenzierung und arraybasierter comparativer genomischer Hybridisierung (Array CGH) wurden Veränderungen des Gens bzw der genomischen Region identifiziert. Im weiteren wurden die Mutationen mittels EMSA und Mini Gene Reporter Assay funktionell charakterisiert, sowie außerdem Expressionsanalysen embryonaler Mausgewebe von *NKX2-1* als auch des genomisch benachbart liegenden *MBIP* durchgeführt.

In 101 untersuchten Patienten konnten 17 heterozygote Punktmutationen und 10 heterozygote Deletionen identifiziert werden. Neurologische Symptome, meist in Form einer Choreathetose, fanden sich bei allen Patienten (100%), diese war interindividuell unterschiedlich kombiniert mit pulmonaler Affektion (78%) und Schilddrüsendysfunktion (75%). Es wurden außerdem bisher nicht in Zusammenhang mit *NKX2-1* Mutationen beschriebene Symptome wie verändertes Längenwachstum, unklare Fieberepisoden und Herzseptumdefekte nachgewiesen. Zudem ergaben sich Hinweise, dass eine nur verminderte DNA-Bindungskapazität bei einer der nachgewiesenen Mutationen einen milderen Phänotyp verursacht. Zwei heterozygote Deletionen hingegen betrafen nicht *NKX2-1* selbst, sondern *MBIP*, welches - durch die gezeigte räumliche und zeitliche Koexpression in Mausembryonen - möglicherweise eine Rolle in der Entwicklung der betroffenen Organsysteme spielt.

Die hohe Inzidenz von *NKX2-1* Mutationen in der untersuchten Kohorte legt eine routinemäßige Untersuchung von Patienten mit korrespondierenden Symptomen nahe. Jedoch sollte eine Analyse sich nicht auf die primäre Gensequenz beschränken, sondern vielmehr - unter Verwendung von „Next Generation Sequencing“ (NGS)-Technologien - auch die umliegende genomische Region und mögliche regulatorische Sequenzen miteinbeziehen.

*NKX2-1* encodes a transcription factor with large impact on the development of brain, lung and thyroid. Germline mutations of *NKX2-1* can lead to dysfunction and

---

malformations of these organs. Starting from the largest coherent collection of patients with a suspected phenotype to date, we systematically evaluated frequency, quality and spectrum of phenotypic consequences of NKX2-1 mutations.

After identifying mutations by Sanger sequencing and array CGH, we comprehensively reanalysed the phenotype of affected patients and their relatives. We employed electrophoretic mobility shift assay (EMSA) to detect alterations of NKX2-1 DNA binding. Gene expression was monitored by means of in situ hybridisation and compared with the expression level of MBIP, a candidate gene presumably involved in the disorders and closely located in close genomic proximity to NKX2-1.

Within 101 index patients, we detected 17 point mutations and 10 deletions. Neurological symptoms were the most consistent finding (100%), followed by lung affection (78%) and thyroidal dysfunction (75%). Novel symptoms associated with NKX2-1 mutations comprise abnormal height, bouts of fever and cardiac septum defects. In contrast to previous reports, our data suggest that missense mutations in the homeodomain of NKX2-1 not necessarily modify its DNA binding capacity and that this specific type of mutations may be associated with mild pulmonary phenotypes such as asthma. Two deletions did not include NKX2-1, but MBIP, whose expression spatially and temporarily coincides with NKX2-1 in early murine development.

The high incidence of NKX2-1 mutations strongly recommends the routine screen for mutations in patients with corresponding symptoms. However, this analysis should not be confined to the exonic sequence alone, but should take advantage of affordable NGS technology to expand the target to adjacent regulatory sequences and the NKX2-1 interactome in order to maximise the yield of this diagnostic effort.

---

## II. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Anne Thorwarth, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Molekulargenetische und molekularzytogenetische Analyse des NKX2.1 Gens bei Patienten mit kongenitaler Hypothyreose und assoziierter Choreoathetose “ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben ist.

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

---

Datum, Unterschrift der Doktorandin

### III. AUSFÜHRLICHE ANTEILSERKLÄRUNG AN DER ERFOLGTEN PUBLIKATION

#### PUBLIKATION:

Anne Thorwarth, Sarah Schnittert-Hübener, Pamela Schrumpf, Ines Müller, Sabine Jyrch, Christof Dame, Heike Biebermann, Gunnar Kleinau, Juri Katchanov, Markus Schülke, Grit Ebert, Anne Steininger, Carsten Bönemann, Knut Brockmann, Hans-Jürgen Christen, Patricia Crock, Francis deZegher, Matthias Griese, Jacqueline Hewitt, Sten Ivarsson, Christoph Hübner, Klaus Kapelari, Barbara Plecko, Dietz Rating, Iva Stoeva, Hans-Hilger Ropers, Annette Grüters, Reinhard Ullmann, Heiko Krude, **Comprehensive genotyping and clinical characterisation reveal 27 novel NKX2-1 mutations and expand the phenotypic spectrum** *J Med Genet* 2014;0:1–13. doi:10.1136/jmedgenet-2013-102248

#### BEITRAG IM EINZELNEN:

Der experimentelle Anteil der Promovendin an dieser Publikation lag für die Genotypisierung (Sanger Sequencing und Array CGH, Bruchpunkt-PCR und Auswertung) bei 100%, für die funktionelle Charakterisierung der nachgewiesenen Mutationen bzw Deletionen (EMSA, NKX2-1 Strukturmodell, Mini Gene reporter assay mit Zelltransfektion, Maus in situ Hybridisierungen) bei 40%, sowie für die Phänotypisierung bei 20%.

Somit hat die Promovendin folgende experimentelle Anteile an den Abbildungen: Abbildung 1A 100%, 1B 10%, 1C 10%, 1D 95%; Abbildung 2A 100%, 2B 100%, 2C 100%; Abbildung 3A 100%, 3B 100%, 3C 0%; Abbildung 4 100%; Abbildung 5A 10%, 5B 10%; Tabelle 1 100%; Supplement Tabelle 1 100%; Supplement Abbildung 1 100%; Supplement Abbildung 2 100%; Supplement Abbildung 3 100%; Supplement Abbildung 4 100%; Supplement Abbildung 5 0%; Design aller Abbildungen 100%.

Die strukturelle sowie inhaltliche Planung, die Analyse und Interpretation aller Daten und das Verfassen des Artikels erfolgte gemeinsam mit den beiden Letztautoren.

Die große Zahl an Koautoren erklärt sich unter anderem dadurch, daß 13 Autoren (Carsten Bönemann, Knut Brockmann, Hans-Jürgen Christen, Patricia Crock, Francis deZegher, Matthias Griese, Jacqueline Hewitt, Sten Ivarsson, Christoph Hübner, Klaus Kapelari, Barbara Plecko, Dietz Rating und Iva Stoeva) in

internationaler Kooperation der Studie diejenigen Patienten zugeführt haben, bei denen sich der klinische Anfangsverdacht auf das Vorliegen einer NKX2-1 Aberration bestätigen ließ.

Wesentlichen Anteil an der klinischen Datenerhebung der Arbeit hatte Sarah Schnittert-Hübener.

Die Autoren Pamela Schrumpf, Christof Dame, Gunnar Kleinau Heike Biebermann, Ines Müller, Sabine Jyrch, Juri Katchanov, Markus Schülke, Grit Ebert, Anne Steininger haben das Projekt bei der Durchführung der Experimente bzw bei der Auswertung der Daten unterstützt.

---

Datum, Unterschrift der Doktorandin

## IV. AUSZUG AUS DER „JOURNAL SUMMARY LIST“

WELCOME ? HELP 2012 JCR Science Edition

**Journal Summary List** Journal Title Changes

Journals from: **subject categories GENETICS & HEREDITY** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by: **Impact Factor** [SORT AGAIN](#)

---

Journals 1 - 20 (of 161) Page 1 of 9

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)

 << << [ 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 ] >> >>

*Ranking is based on your journal and sort selections.*

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <small>(linked to journal information)</small>	ISSN	JCR Data <small>↓</small>						Eigenfactor® Metrics <small>↓</small>	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor® Score	Article Influence® Score
<input type="checkbox"/>	1	NAT REV GENET	1471-0056	23358	41.063	36.400	6.314	70	4.9	0.12411	18.700
<input type="checkbox"/>	2	NAT GENET	1061-4036	81183	35.209	34.520	5.511	225	6.8	0.30757	17.402
<input type="checkbox"/>	3	ANNU REV GENET	0066-4197	6772	17.436	21.789	0.312	32	8.0	0.02279	11.447
<input type="checkbox"/>	4	TRENDS ECOL EVOL	0169-5347	24279	15.389	17.112	2.974	76	8.9	0.05209	7.274
<input type="checkbox"/>	5	GENOME RES	1088-9051	28856	14.397	14.104	3.416	238	5.7	0.13170	7.473
<input type="checkbox"/>	6	GENE DEV	0890-9369	57627	12.444	12.741	2.149	249	8.9	0.17180	7.123
<input type="checkbox"/>	7	AM J HUM GENET	0002-9297	34687	11.202	12.512	2.188	223	8.6	0.09874	5.976
<input type="checkbox"/>	8	MOL BIOL EVOL	0737-4038	32168	10.353	11.221	1.561	294	6.3	0.09519	4.046
<input type="checkbox"/>	9	GENOME BIOL	1474-7596	17478	10.288	8.959	1.537	147	5.6	0.08553	4.678
<input type="checkbox"/>	10	TRENDS GENET	0168-9525	10798	9.772	9.325	2.101	69	8.3	0.03258	4.735
<input type="checkbox"/>	11	ANNU REV GENOM HUM G	1527-8204	2327	9.500	14.125	0.600	20	4.9	0.01186	7.072
<input type="checkbox"/>	12	PLOS GENET	1553-7404	22212	8.517	9.440	1.204	691	3.4	0.17335	4.955
<input type="checkbox"/>	13	HUM MOL GENET	0964-6906	36041	7.692	7.541	1.554	478	6.6	0.11234	3.076
<input type="checkbox"/>	14	CURR OPIN GENET DEV	0959-437X	8178	7.470	8.209	1.538	80	6.8	0.03333	4.377
<input type="checkbox"/>	15	ONCOGENE	0950-9232	60526	7.357	7.180	2.218	458	7.7	0.14406	2.759
<input type="checkbox"/>	16	MOL THER	1525-0016	12759	7.041	6.457	1.676	219	4.8	0.04047	1.969
<input type="checkbox"/>	17	CIRC-CARDIOVASC GENE	1942-325X	1641	6.728	6.398	1.171	82	2.5	0.01063	2.526
<input type="checkbox"/>	18	MUTAT RES-REV MUTAT	1383-5742	2736	6.426	8.202	1.000	22	6.1	0.00734	2.577
<input type="checkbox"/>	19	J.MED. GENET	0022-2593	11563	5.703	5.793	1.353	116	7.9	0.02737	2.389
<input type="checkbox"/>	20	GENET MED	1098-3600	4119	5.560	5.035	1.554	121	4.0	0.01837	2.023

## **V. PUBLIKATION**

[doi: 10.1136/jmedgenet-2013-102248](https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-102248)

**LEBENS LAUF**

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

## VI. PUBLIKATIONSLISTE

### PUBLIKATIONEN

Anne Thorwarth, Sarah Schnittert-Hübener, Pamela Schrumpf, Ines Müller, Sabine Jyrch, Christof Dame, Heike Biebermann, Gunnar Kleinau, Juri Katchanov, Markus Schülke, Grit Ebert, Anne Steininger, Carsten Bönnemann, Knut Brockmann, Hans-Jürgen Christen, Patricia Crock, Francis deZegher, Matthias Griese, Jacqueline Hewitt, Sten Ivarsson, Christoph Hübner, Klaus Kapelari, Barbara Plecko, Dietz Rating, Iva Stoeva, Hans-Hilger Ropers, Annette Grüters, Reinhard Ullmann, Heiko Krude, **Comprehensive genotyping and clinical characterisation reveal 27 novel NKX2-1 mutations and expand the phenotypic spectrum** *J Med Genet* 2014;0:1–13. doi:10.1136/jmedgenet-2013-102248

Impact Factor: 5,703

Thorwarth A, Mueller I, Biebermann H, Ropers HH, Grueters A, Krude H, Ullmann R., **Screening chromosomal aberrations by array comparative genomic hybridization in 80 patients with congenital hypothyroidism and thyroid dysgenesis** *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Jul;95(7):3446-52. doi: 10.1210/jc.2009-2195. Epub 2010 Apr 28.

Impact Factor: 6.495

### KONGRESSBEITRÄGE

Vortrag, 10th European Congress of Endocrinology, 2008

OC2.2 Anne Thorwarth, Sarah Schnittert, Sabine Jyrch, Christof Dame, Heike Biebermann, Annette Grueters & Heiko Krude “Identification of 25 novel NKX2-1 gene mutations in 100 patients with broad spectrum of brain and thyroid dysfunctions”; *Endocrine Abstracts* (2008) 16 OC2.2

Vortrag, 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 2008

W10 05 Thorwarth A., Biebermann H., Ropers H.-H., Grüters A., Ullmann R., Krude H. “Identification of 27 novel NKX2–1 mutations in 102 patients with broad spectrum of brain and thyroid dysfunctions”; *Medizinische Genetik* 2008; 20(1)

Vortrag Annual Meeting of the European Thyroid Association, 2009

*OP72* Krude H, Thorwarth A, Schnittert S, Biebermann H, Jyrch S, Dame C, Ropers H-H, Grueters A, Ullmann R “Identification of 28 novel NKX2-1 mutations in 102 patients with broad spectrum of brain and thyroid dysfunctions”

Vortrag Annual Meeting of the European Thyroid Association, 2009

*OP76* Thorwarth A, Mueller I, Biebermann H, Ropers H-H, Grueters A, Ullmann R, Krude H, “Screening for chromosomal Aberrations by Array CGH in 80 patients with Congenital Hypothyroidism due to thyroid dysgenesis”

## VII. DANKSAGUNG

Mein vorderster und ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Heiko Krude für die fortwährende, intensive Betreuung, für seine Begeisterungsfähigkeit und ständige Diskussionsbereitschaft und für seine unzähligen Ideen und Anregungen.

Frau Prof. Annette Grüters möchte ich, nicht nur in der Rolle als anfänglicher Doktormutter, für das mir fortwährend entgegengebrachte Vertrauen herzlich danken.

Herrn PD Dr. Reinhard Ullmann als Mitbetreuer dieser Arbeit gebührt selbstverständlich ein umfassender Dank für die Aufnahme in sein Labor und für die Zeit und Hilfsbereitschaft, mit der er mir zur Seite gestanden hat.

Besonders gedankt sei auch allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Instituts für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie sowie der Arbeitsgruppe für Molekulare Zytogenetik am Max-Planck Institut für Molekulare Genetik für die andauernde Offenheit und Hilfsbereitschaft- allen voran Frau PD Dr. Heike Biebermann, die mir besonders zu Beginn meiner Forschungsarbeit einen wunderbaren Einstieg in die Laborarbeit ermöglicht hat.

Ein großer Dank gilt auch Sarah Schnittert, die nicht nur durch ihre eigene Arbeit zum Thema, sondern auch und vor allem durch unzählige Gespräche und Diskussionen zu jedem Zeitpunkt eine große Unterstützung war.

Exponierte Stellung haben natürlich nicht nur die fachlich am Entstehen dieser Arbeit beteiligten Personen. Daher besonderer Dank an Miriam, Christina, Kathrin, Naomi, Marc und all die anderen.

Zuletzt und selbstverständlich allergrößten Dank an meine Familie, die mir so viel mit auf den Weg gegeben und ermöglicht hat, und jederzeit zur Unterstützung bereit war.