

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

*In silico* Analyse der Spleißmutation c.602dup in *DUOX2* sowie deren Auswirkung auf  
den klinischen Phänotyp bei Patienten mit kongenitaler Hypothyreose

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Elisa Carina Ingelfinger  
aus Villingen-Schwenningen

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

06. Dezember 2022

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

<b>1. Einleitung/ Ziel der Dissertation.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturdiskussion .....</b>	<b>2</b>
2.1. Anatomie der Schilddrüse .....	2
2.2 Embryologie der Schilddrüse .....	3
2.3 Synthese der Schilddrüsenhormone .....	4
2.4 Duale Oxidase 2 (DUOX 2).....	7
2.5 Regulation der Hormonfreisetzung.....	9
2.6 Wirkung der Schilddrüsenhormone .....	10
2.7 Kongenitale Hypothyreose .....	13
2.8 Spleißen.....	15
2.9 Die Rolle von Cis-acting elements beim Spleißen.....	18
2.10 Spleiß-Mutationen .....	19
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
3.1 Vorstellung der Patientin A.....	20
3.2 Vorstellung der Patientin B.....	22
3.3 Im Vorfeld der Arbeit erfolgte <i>in vitro</i> Analysen .....	23
3.3.1 Sequenzierung der Kandidatengene der kongenitalen Hypothyreose .....	23
3.3.2 Isolation und Sequenzierung der RNA aus Lymphozyten der Patientin.....	24
3.3.3 Analyse des Spleißverhaltens durch transiente Transfektion von HeLa Zellen .....	24
3.4 <i>In silico</i> Analysen der Mutationen c.602dup und c.1516G>A .....	25
3.4.1 Einfluss der Mutation c.602 dup auf das Spleißverhalten .....	25

3.4.2 Mögliche Ursachen einer Veränderung des Spleißens durch die Mutation c.602dup .....	25
3.4.3 Auswirkungen der Mutationen c.602dup und c.1516G>A auf die Aminosäuresequenz .....	26
3.4.4 Auswirkungen der Mutationen c.602dup und c.1516G>A auf die Proteinstruktur .....	26
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
4.1 Sequenzierung der genomischen DNA der Patientin A, ihrer Mutter und ihres Vaters.....	27
4.2 Sequenzierung der genomischen DNA der Patientin B, ihrer Mutter, ihres Vaters und ihres Bruders .....	28
4.3 Sequenzierung der cDNA zur Analyse des Spleißverhaltens der c.602dup Mutation .....	29
4.4 <i>In silico</i> Analyse der Auswirkungen der Mutation c.602dup auf das Spleißverhalten .....	30
4.5 Mögliche Ursachen einer Veränderung des Spleißens durch die Mutation c.602dup .....	31
4.6 <i>In silico</i> Analyse der Auswirkungen der Mutation c.602dup auf die Proteinsequenz .....	33
4.7 <i>In silico</i> Analyse der Auswirkungen der Mutation c.602dup auf die DUOX2 Proteinstruktur.....	35
4.8 <i>In silico</i> Analyse der Auswirkungen der Mutation c.1516G>A auf die Proteinsequenz .....	37
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>38</b>
5.1 Analyse der durch die Spleißmutation c.602dup veränderten ESEs/ESSs .....	38
5.2 Diskussion des klinischen Verlaufs der Patientin A.....	40
5.3 Monoallelische Expression als Erklärungsversuch für den verschiedenen Phänotyp bei Patientin A und ihrer Mutter.....	41
5.4 Diskussion des klinischen Verlaufs der Patientin B.....	44

5.5 <i>Nonsense-mediated mRNA decay</i> als Erklärungsversuch für den Phänotyp der Patientin B.....	46
5.6 Vergleich des klinischen Verlaufs der Patientinnen A und B mit den in der Literatur beschriebenen Patienten/-innen .....	47
5.6.1. Auswirkungen der Mutationen auf den Schweregrad der Hypothyreose ..	47
5.6.2 Mutationen im <i>DUOX2/DUOX2</i> bzw. <i>DUOX1/DUOX1</i> System .....	48
5.6.3 In der Literatur beschriebene Spleißmutationen im <i>DUOX2</i> Gen .....	49
5.7 Therapeutische Möglichkeiten bei Spleiß-Mutationen.....	51
5.8 Effekte eines <i>Duox2</i> - Ausfalls bei Knockout-Mäusen.....	53
5.9 Räumliche Struktur von <i>DUOX2</i> .....	55
5.10 Mögliche Auswirkung der Mutation c.602dup auf die subzelluläre Lokalisation des <i>DUOX2</i> Proteins.....	57
5.11 Interaktion von <i>DUOX2</i> mit seinem Reifungsfaktor <i>DUOX2</i> .....	60
5.12 Interaktion von <i>DUOX1</i> mit <i>DUOX2</i> .....	62
5.13 Interaktion von <i>DUOX2</i> mit weiteren Proteinen.....	64
5.14 Ausblick.....	66
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>68</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>69</b>
<b>8. Danksagung.....</b>	<b>76</b>
<b>9. Tabellarischer Lebenslauf .....</b>	<b>77</b>

## Abkürzungsverzeichnis

(f)T3	(freies) Trijodthyronin
(f)T4	(freies) Tetrajodthyronin
5'	5'-Ende der DNA mit Phosphatrest
3'	3'-Ende der DNA mit OH-Gruppe
AF	auxiliary factor
ATP	Adenosintriphosphat
BBP	branch point binding protein
DAZAP1	deleted in azoospermia-associated protein 1
DEHAL1	Dehalogenase 1
DIT	Diiodthyrosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DUOX	Duale Oxidase
DUOXA	Reifungsfaktor der Dualen Oxidase
EFP1	EF-hand binding protein 1
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESE	exonic splicing enhancer
ESS	exonic splicing silencer
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMRP	fragile X mental retardation protein
FOXE1	forkhead box E1
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HiDi	Highly deionized
hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
ISE	intronic splicing enhancer
ISS	intronic splicing silencers
LB-Medium	lysogeny broth Medium
MIT	Monoiodthyrosin
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NIS	Natrium-Jodid-Symporter
NKX2.1/ NKX2.5	NK2 homeobox 1/ NK2 homeobox 5

NOX	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat Oxidase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Hyperoxid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OH-Gruppe	Hydroxygruppe
ORF	open reading frame
p.c.	post conceptionem
PAX8	Paired-Box-Protein 8
PCR	Polymerasekettenreaktion
prä-mRNA	Vorläufer messenger Ribonukleinsäure
RME	random monoallelic expression
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RRM	RNA-Erkennungsmotiv (RNA-recognition motif)
RS-Domäne	Domäne mit vielen Arginin/Serin-Dipeptiden
rT3	reverses T3
RXR	retinoid X receptor
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SLC26A4	Pendrin
SMN	survival motor neuron
snRNA	small nuclear RNA
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
SR Proteine	Serin/Arginin-reiche Proteine
SRE	splicing-regulatory element
SRP	signal recognition particle
SSW	Schwangerschaftswoche
STAT 1	signal transducer and activator of transcription 1
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA Puffer
TG	Thyreoglobulin
T <sub>H</sub> 2	T-Helferzellen vom Typ 2
THOX2	Thyroidoxidase 2
TPO	Thyreoperoxidase
TRE	thyroid hormone response element
TRH	thyrotropin-releasing-hormone
TSH	thyroid-stimulating hormone
TXNDC11	thioredoxin domain containing protein 11

## Einheiten:

g	Gramm	l	Liter
mg	Milligramm	dl	Deziliter
µg	Mikrogramm	ml	Milliliter
ng	Nanogramm	µl	Mikroliter
cm	Zentimeter	bp	Basenpaare
mm	Millimeter	kbp	Kilobasenpaare
d	Tag	°C	Grad Celsius
min	Minuten	U	Unit (Enzymeinheit)
sek	Sekunden		

## Nukleinbasen:

A	Adenin	T	Thymin
C	Cytosin	U	Uracil
G	Guanin		

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Makroskopie der Schilddrüse, Ansicht von ventral .....	2
Abbildung 2: Histologie der Schilddrüse .....	4
Abbildung 3: Synthese der Schilddrüsenhormone.....	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Lage der Gene <i>DUOX</i> und <i>DUOXA</i> .....	7
Abbildung 5: Schematische Darstellung des DUOX2 Protein .....	8
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Regelkreises der Schilddrüsenhormon- Freisetzung .....	10
Abbildung 7: Chemische Struktur der Schilddrüsenhormone T3, T4 und rT3 .....	11
Abbildung 8: Konservierte Sequenzen an den Spleißstellen und der Verzweigungsstelle .....	15
Abbildung 9: Bildung und Abbau der einzelnen Komplexe des Spleißosoms. ....	17
Abbildung 10: Elektropherogramme der Sequenzierung von Exon 6 des <i>DUOX2</i> Gens der Patientin A, ihrer Mutter und ihres Vaters.....	27
Abbildung 11: Elektropherogramme der Sequenzierung von Exon 13 des <i>DUOX2</i> Gens der Patientin B, ihrer Mutter, ihres Vaters und ihres Bruders.....	28



Abbildung 12: Sequenzierung der cDNA .....	29
Abbildung 13: <i>In silico</i> Analyse des Spleißverhaltens der Wildtypsequenz und der mutierten Sequenz des Bereiches Intron 5 bis einschließlich Intron 6 von <i>DUOX2</i> .....	30
Abbildung 14: <i>In silico</i> Analyse der Ursachen der Spleißmutation c.602dup mithilfe von SpliceAid .....	32
Abbildung 15: Aminosäuresequenz des <i>DUOX2</i> Wildtyps, der Frameshift-Variante sowie der Spleiß-Variante der Mutation c.602dup .....	35
Abbildung 16: Schematische Darstellung der vorhergesagten Proteinstruktur des <i>DUOX2</i> Wildtyp Proteins .....	35
Abbildung 17: Schematische Darstellung der vorhergesagten Proteinstruktur des mutierten <i>DUOX2</i> Proteins .....	36
Abbildung 18:A) Auswirkungen der Mutation c.1516G>A auf die Proteinsequenz, B) Lokalisation der Mutation c.1516G>A im <i>DUOX2</i> Protein .....	37
Abbildung 19: Wirkung des Medikaments Nusinersen .....	52
Abbildung 20: Intramolekulare Disulfidbrücke in <i>DUOX2</i> .....	55
Abbildung 21: Synthese eines Transmembranproteins .....	57
Abbildung 22: Position der wichtigen Erkennungssequenzen für den Transport der <i>DOUX2</i> Proteine .....	59
Abbildung 23: Schematische Darstellung der Struktur und der Disulfidbrücken zwischen <i>DUOX2</i> und <i>DUOXA2</i> .....	62
Abbildung 24: Schematische Darstellung der Spleißvarianten von <i>DUOXA1</i> .....	63
Abbildung 25: Interaktion von <i>DUOX2</i> mit weiteren Proteinen .....	64

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verlauf der Schilddrüsenwerte sowie verordnete L-Thyroxin-Dosen bei der Patientin A.....	21
Tabelle 2: Verlauf der Schilddrüsenwerte sowie verordnete L-Thyroxin-Dosen bei der Patientin B.....	23

## 1. Einleitung/ Ziel der Dissertation

Die kongenitale Hypothyreose ist die häufigste angeborene endokrine Störung und betrifft ungefähr 1:3500 Neugeborenen. In 15-20 % wird sie durch einen Defekt in der Biosynthese der Schilddrüsenhormone hervorgerufen. (1)

Das Protein Duale Oxidase 2 (DUOX2), welches auch als Thyroidoxidase 2 (THOX2) bezeichnet wird, spielt bei der Herstellung der Schilddrüsenhormone eine wichtige Rolle. Es ist in der apikalen Membran der Schilddrüsenzelle lokalisiert und an der Produktion von Wasserstoffperoxid beteiligt. Dieses wird als Cofaktor für die Organifikation des Jods benötigt. Mutationen im *DUOX2* Gen können somit zu einer Störung der Hormonbiosynthese und folglich zu einer kongenitalen Hypothyreose führen. (1)

In den letzten Jahren wurden viele wichtige Enzyme und Cofaktoren, welche an der Schilddrüsenhormonsynthese beteiligt sind, identifiziert und kloniert. Dadurch ist es möglich, mittels molekularer Analysen die zugrundeliegende pathogene Mutation festzustellen. Hierzu werden vor allem die Kandidatengene *Thyreoperoxidase (TPO)*, *Thyreoglobulin (TG)*, *Pendrin (SLC26A4)*, *Natrium-Jodid-Symporter (NIS, SLC5A5)*, *SLC26A7*, *Dehalogenase 1 (DEHAL1)*, *Duale Oxidase 2 (DUOX2)* und der Reifungsfaktor von *DUOX2 (DUOXA2)* untersucht.

### Ziel der Dissertation

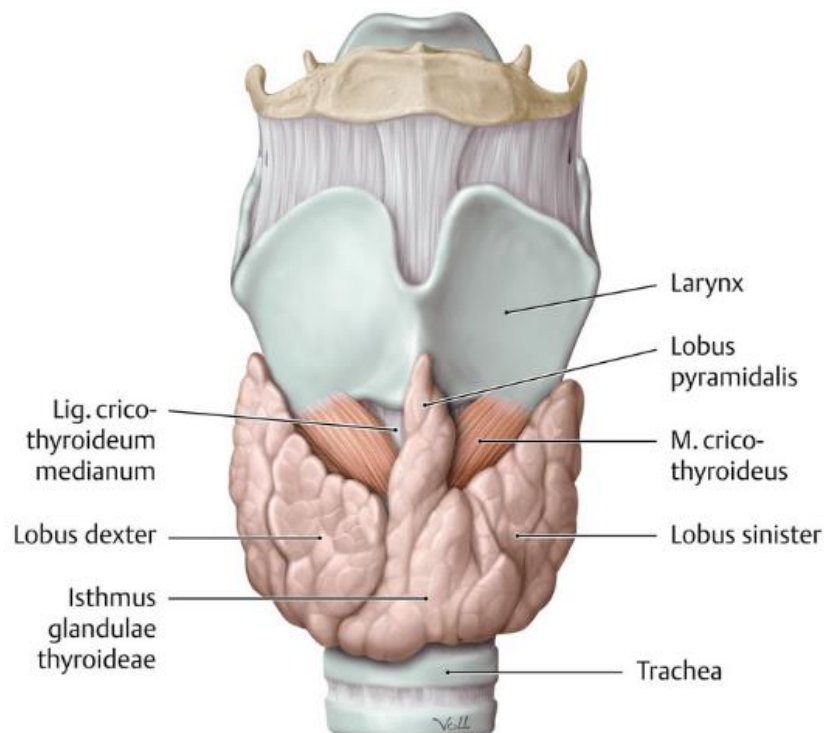
Im Labor „Molekulare Pädiatrische Endokrinologie“ unter Leitung von Prof. Pohlenz wurde bei zwei Mädchen mit einem Schilddrüsenhormonsynthesedefekt die Mutation c.602dup im *DUOX2* Gen gefunden (2). Theoretisch führt diese Mutation zu einem Frameshift und damit zu einem verkürzten DUOX2 Protein (p.Gln202Thrfs\*99). *In vitro* konnte allerdings durch die Isolation von RNA aus den Lymphozyten einer der Patientinnen gezeigt werden, dass die Mutation c.602dup das Spleißen verändert. Dies wurde durch die transiente Transfektion von HeLa Zellen mit dem mutationstragenden *DUOX2* Genabschnitt, anschließender RNA Isolation und Sequenzierung bestätigt. Durch die vorliegende Arbeit soll die Mutation c.602dup *in silico* analysiert werden. Dadurch soll gezeigt werden, welche Mechanismen für das veränderte Spleißen verantwortlich sind. Außerdem sollen die Variabilität des Phänotyps zwischen den Patientinnen verglichen und Erklärungsansätze dafür erörtert werden.

## 2. Literaturdiskussion

### 2.1. Anatomie der Schilddrüse

Die Schilddrüse, lateinisch Glandula thyroidea, liegt ventral der Trachea. Sie besteht aus zwei seitlichen Lappen, dem Lobus dexter und Lobus sinister, sowie aus dem in der Mitte gelegenen Isthmus glandulae thyroideae, welcher sich nach kranial als Lobus pyramidalis fortsetzt (3) (siehe Abbildung 1). Beim Erwachsenen wiegt die Schilddrüse zwischen 15 und 25 Gramm (3).

Die Hauptfunktion der Schilddrüse besteht in der Produktion der Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T3) und Tetrajodthyronin (T4), welche eine entscheidende Rolle bei der geistigen und körperlichen Entwicklung sowie im menschlichen Stoffwechsel spielen (4). Außerdem wird in den parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse das Peptidhormon Calcitonin gebildet, welches an der Regulation des Calciumstoffwechsels beteiligt ist (5).



**Abbildung 1: Makroskopie der Schilddrüse, Ansicht von ventral**

Die Schilddrüse besteht aus zwei Lappen (Lobus dexter und Lobus sinister), welche durch den Isthmus glandulae thyroideae verbunden sind. Dieser setzt sich als Lobus pyramidalis nach kranial fort. Die Schilddrüse liegt kaudal des Larynx und ventral der Trachea. Abkürzungen: Lig.: Ligamentum, M.: Musculus

*Bildquelle: Kopf, Hals und Neuroanatomie: 123 Tabellen. Prometheus: LernAtlas der Anatomie / Michael Schünke; Erik Schulte; Udo Schumacher III von Markus Voll 4. Aufl. ed. Stuttgart u.a.2015.; Kapitel 5.41; Schilddrüse, Ansicht von ventral*

## 2.2 Embryologie der Schilddrüse

Die Schilddrüse entwickelt sich aus einer medianen und einer lateralen Anlage, die später miteinander verschmelzen (6).

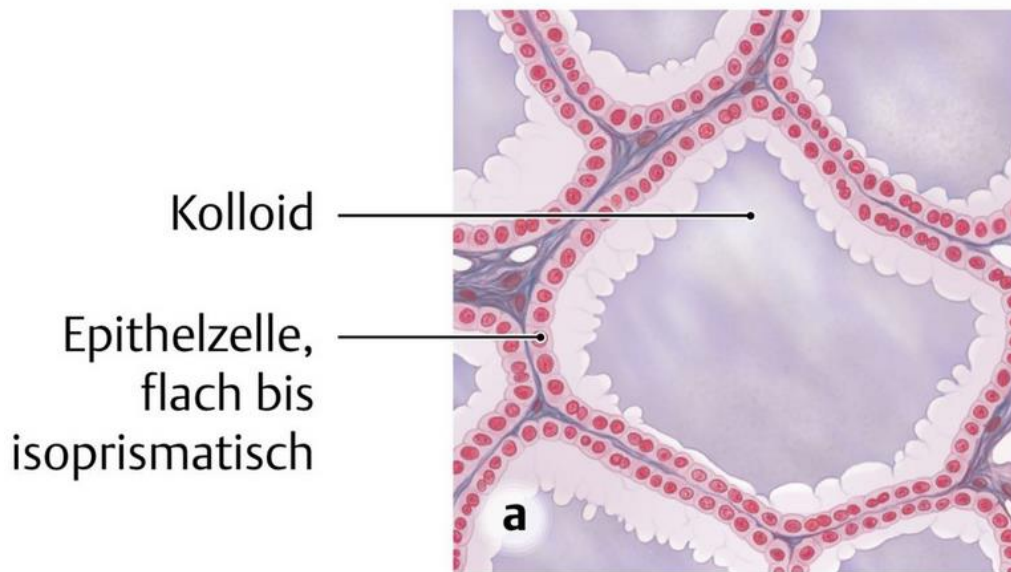
Die Follikel­epithel­zellen entstehen aus dem Entoderm des primitiven Darmrohrs und bilden die mediane Anlage (6). Am 22. Tag *post conceptionem* (p.c.) wird diese als Verdickung des Epithels des Entoderms am Boden des Pharynx sichtbar (6, 7). Am 26. Tag p.c. kommt es zur Ausstülpung einer Knospe, welche sich in direkter Nachbarschaft zum Aortensack befindet und ab dem 32. Tag p.c. nach kaudal wandert (6, 7). Anfangs steht die Schilddrüse über den Ductus thyreoglossus mit dem Mundboden in Verbindung, bevor sich dieser verschließt und als Foramen caecum lingue zurückbleibt (7). Anschließend teilt sich die mediane Anlage und das Schilddrüsengewebe breitet sich beidseits entlang der Gefäße des dritten Kiemenbogens aus (7). So bilden sich die beiden seitlichen Lappen, welche in der Mitte durch den Isthmus thyroideae verbunden bleiben (7).

Die C-Zellen entstehen aus dem neuroektodermalen Gewebe der Ultimobranchialkörper der vierten Schlundtasche (6). Diese bilden die lateralen Anlagen und verschmelzen am 44. Tag p.c. jeweils mit den beiden seitlichen Lappen (7). Die nun komplette Organanlage erreicht am 48. Tag p.c. ihre endgültige prätracheale Position (6).

Im Anschluss erfolgt die terminale Differenzierung in struktureller und funktioneller Hinsicht, welche vier Gestationswochen dauert. Hier bilden sich zuerst Stränge undifferenzierter Follikel­epithel­zellen, welche sich dann zunehmend polarisieren und zu kleinen Follikeln anordnen. Auf zellulärer Ebene erhalten die Thyreozyten die Funktionen, Iodid an der basolateralen Membran aufzunehmen, Thyreoglobulin zu synthetisieren und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) zu generieren. Ab der 11. Gestationswoche kann T4 in der fetalen Schilddrüse und ab der 12. Woche im fetalen Blut nachgewiesen werden. (6)

## 2.3 Synthese der Schilddrüsenhormone

Die Hormone Trijodthyronin (T3) und Tetrajodthyronin (T4), auch Thyroxin genannt, werden in den Follikeln der Schilddrüse synthetisiert. Diese bestehen aus einer einschichtigen Reihe von Follikelepithelzellen (Thyreozyten), die eiförmig um ein zentrales Lumen angeordnet sind (siehe Abbildung 2). Dieses ist mit Kolloid gefüllt, welches den Speicherort der Schilddrüsenhormone darstellt. (8)



**Abbildung 2: Histologie der Schilddrüse**

Die Follikelepithelzellen umgeben das mit Kolloid gefüllte Lumen.

*Bildquelle: Kopf, Hals und Neuroanatomie: 123 Tabellen. Prometheus: LernAtlas der Anatomie / Michael Schünke; Erik Schulte; Udo Schumacher III von Markus Voll 4. Aufl. ed. Stuttgart u.a.2015.; Kapitel 5.41; Histologie der Schilddrüse*

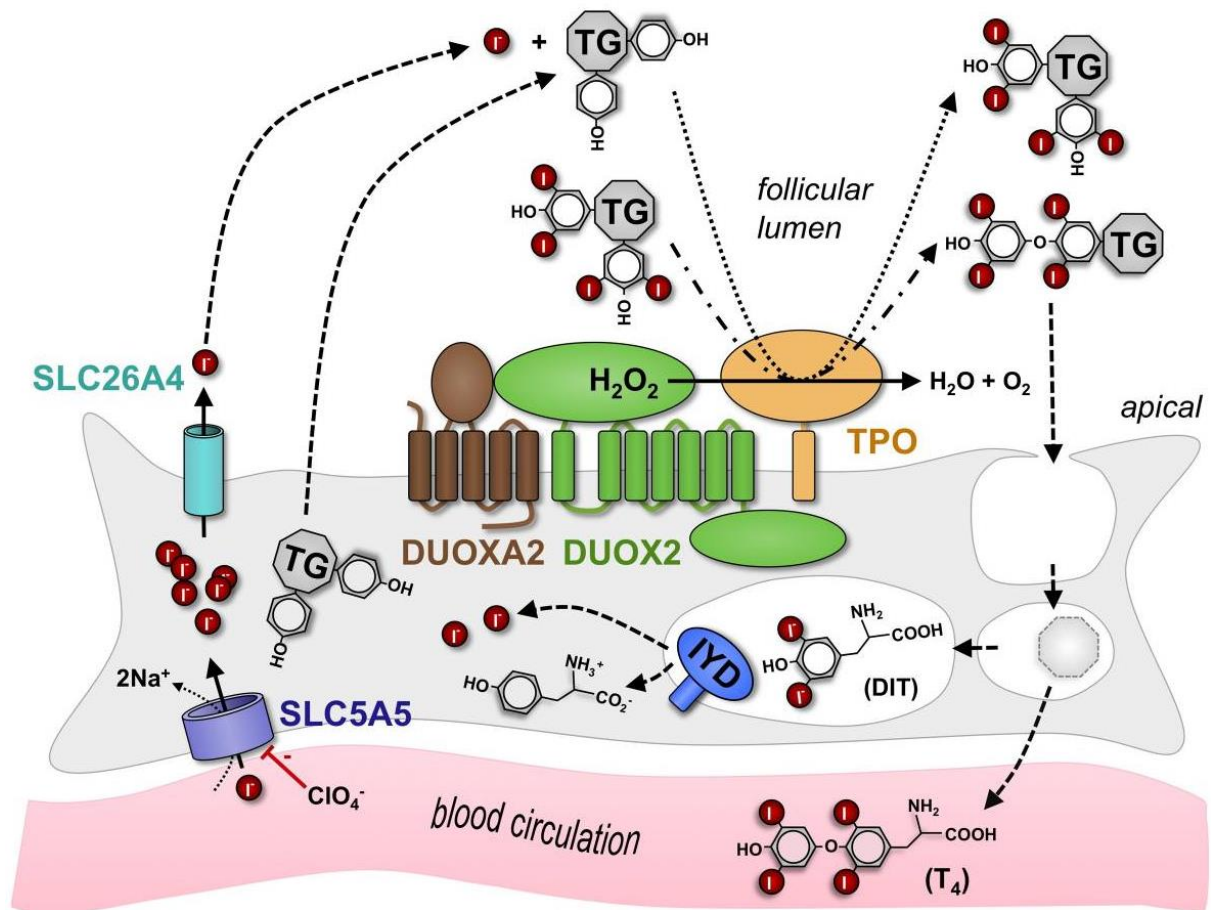
Da die Schilddrüsenhormone jodierte Derivate der Aminosäure Tyrosin sind, muss für ihre Synthese Iodid aus dem Blut aufgenommen werden. Dies geschieht unter anderem über den Natrium-Iodid-Symporter (NIS), der an der basolateralen Zellmembran der Thyreozyten lokalisiert ist. Der NIS ist sekundär aktiv, wird also durch einen Natriumgradienten betrieben, welcher durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aufrechterhalten wird. An der apikalen Membran wird das Iodid über den Pendrin-Carrier ( $\text{Cl}^-/\text{I}^-$ -Transporter) in das Follikellumen sezerniert. Weitere Transporter wie CIC5 und Anoctamin-1 können diese Funktion ebenfalls übernehmen. (8, 9)

Die Thyreozyten synthetisieren das Tyrosin-reiche Glykoprotein Thyreoglobulin. Dies ist ein Homodimer, das posttranslational durch Glykosylierungen und Phosphorylierungen modifiziert wird. Anschließend wird es durch Exozytose in das Follikellumen transportiert. (8)

Hier erfolgt die Iodierung von Thyreoglobulin, welche durch die Thyreoperoxidase (TPO) katalysiert wird: Für die Oxidation des Iodids wird  $H_2O_2$  als Cofaktor benötigt. Dieses wird von der Dualen Oxidase 2 (DUOX2), welche in der apikalen Zellmembran lokalisiert ist, bereitgestellt.  $H_2O_2$  oxidiert vorerst die TPO, welche daraufhin das Iodid oxidiert. Anschließend katalysiert die TPO die Jodierung spezifischer Tyrosyl-Reste des Thyreoglobulins, sodass mono- und diiodierte Tyrosylreste (MIT und DIT) entstehen. Diese werden über eine Etherverbindung zu T3- oder T4-Iodthyroninen gekoppelt und verbleiben zunächst proteingebunden im Kolloid. (8, 9)

Damit die Hormone freigesetzt werden können, wird das iodierter Thyreoglobulin durch Endozytose in die Follikelepithelzellen aufgenommen. Dort wird es lysosomal abgebaut und die freigewordenen Schilddrüsenhormone T3 und T4 werden über das Kapillarsystem der Follikel in den Blutkreislauf abgegeben. (8)

Außer der Schilddrüsenhormone T3 und T4 werden bei der Proteolyse des Thyreoglobulins noch andere Iodtyrosine frei, wie zum Beispiel Monoiodtyrosin (MIT) und Diiodtyrosin (DIT). Das Enzym Dehalogenase 1 (DEHAL1) befreit aus ihnen das Iodid, was für die Hormonsynthese wiederverwendet werden kann. Dies geschieht so effizient, dass kaum MIT oder DIT die Schilddrüse verlässt. Die DEHAL 1 ist ein Transmembranprotein und sitzt in den intrazellulären Vesikeln und an der apikalen Membran der Follikelepithelzellen (siehe Abbildung 3). (10)



**Abbildung 3: Synthese der Schilddrüsenhormone**

Iodid wird an der basolateralen Membran über den Natrium-Iodid-Symporter (SCL5A5) aus dem Blut aufgenommen und an der apikalen Membran über den Pendrin-Carrier (SLC26A4) in das Follikellumen sezerniert. Die Thyreoperoxidase (TPO) katalysiert die Iodierung der Tyrosinreste des Thyreoglobulins (TG) und die Kopplung zweier iodierter Tyrosylreste zu Iodthyroninen. Der von der TPO benötigte Cofaktor Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) wird durch die DUOX2 und ihrem Reifungsfaktor DUOX2A bereit gestellt. Zur Freisetzung der Schilddrüsenhormone wird das iodiierte Thyreoglobulin über Endozytose in die Follikel­epithelzelle aufgenommen und lysosomal abgebaut. Nun werden die Hormone T3 und T4 über das Kapillarsystem der Schilddrüse abtransportiert. Andere Iodtyrosine werden durch die Iodthyrosin-Dehalogenase (IYD) deiodiert, damit das Iodid für die Schilddrüsenhormonsynthese weiterverwendet werden kann. Abkürzungen: DIT: Diiodthyrosin

*Bildquelle: Grasberger H, Refetoff S. Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dys­hormonogenesis. Current opinion in pediatrics. 2011;23(4):421-8.*

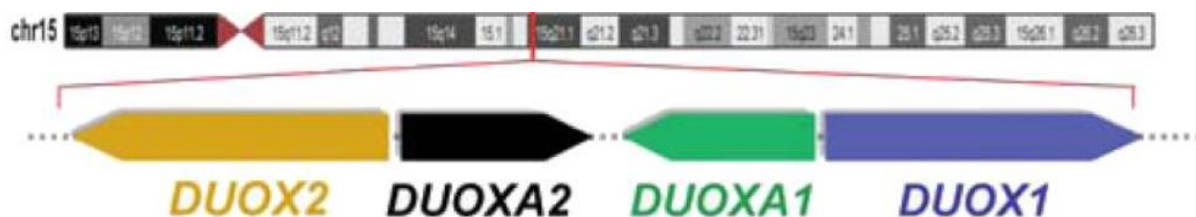


## 2.4 Duale Oxidase 2 (DUOX 2)

Die Duale Oxidase 2 ist eine Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) Oxidase (NOX). Zur NOX-Familie zählen beim Menschen insgesamt 7 Mitglieder: NOX1 bis 5 und DUOX 1 und 2. Sie stellen Transmembranproteine dar, die Elektronen über die Plasmamembran transportieren, um Sauerstoff ( $O_2$ ) zu Hyperoxiden ( $O_2^-$ ) zu reduzieren. Daraus können weitere reaktive Sauerstoffspezies, wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), entstehen. (11)

In der Schilddrüse, der Prostata und den Atemwegsepithelien werden sowohl DUOX1 als auch DUOX2 exprimiert (11). DUOX2 ist zusätzlich in den Speicheldrüsen und im Gastrointestinaltrakt exprimiert (11). In der Schilddrüse scheint aber vor allem DUOX2 für die Produktion von Wasserstoffperoxid verantwortlich zu sein (12). Eventuell kann DUOX1 die Funktion eines ausgefallenen DUOX2 aber teilweise kompensieren (13).

Grasberger et al. identifizierten die Reifungsfaktoren für DUOX1 und DUOX2, welche die Namen DUOXA1 und DUOXA2 tragen. Sie sind während der Synthese der beiden Enzyme für deren Überleitung vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat, deren Reifung und Translokation in die Plasmamembran verantwortlich. Im menschlichen Genom liegen *DUOX* und *DUOXA* auf dem langen Arm von Chromosom 15. Die Gene der Reifungsfaktoren liegen hierbei zwischen den *DUOX* Genen und sind jeweils Kopf-an-Kopf zu diesen orientiert (siehe Abbildung 4). Die *DUOXA* Gene teilen jeweils die Promotor-Region mit den *DUOX* Genen, um eine gemeinsame Expression zu ermöglichen. (14)



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Lage der Gene *DUOX* und *DUOXA***

*DUOXA2* und *DUOXA1* liegen zwischen *DUOX2* und *DUOX1* und sind jeweils Kopf-zu-Kopf mit diesen orientiert.

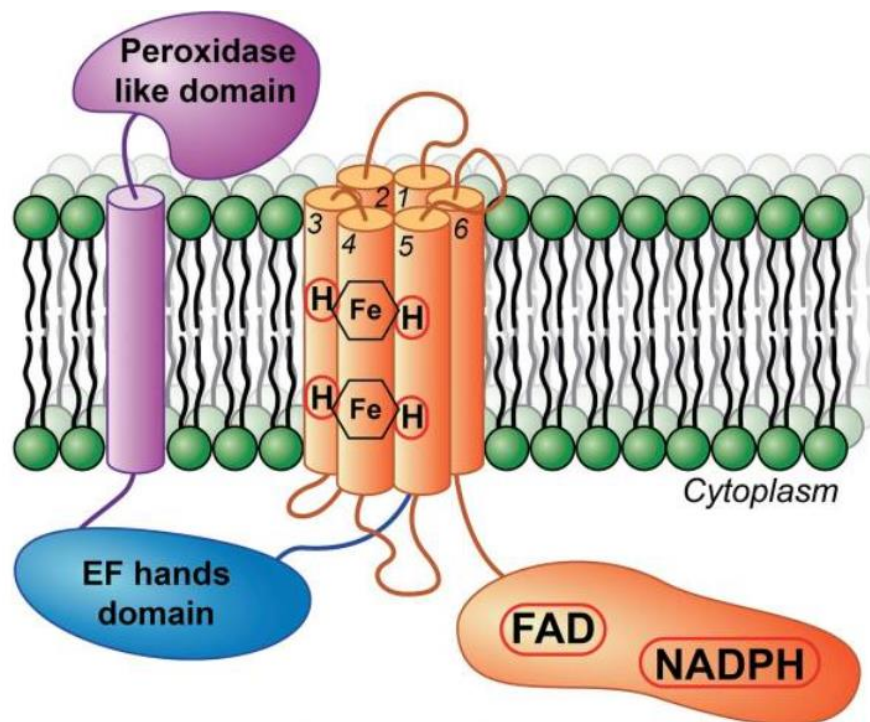
*Bildquelle: Huler I, Hermanns P, Nestoris C, Heger S, Refetoff S, Pohlenz J, et al. A single copy of the recently identified dual oxidase maturation factor (DUOXA) 1 gene produces only mild transient hypothyroidism in a patient with a novel biallelic DUOXA2 mutation and monoallelic DUOXA1 deletion. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2011;96(5):E841-5.*



Das *DUOX2* Gen ist 22 Kilobasenpaare (kbp) lang und besteht aus 33 Exons. Das Enzym *DUOX2* besteht aus 1548 Aminosäuren und zeigt zu 84% Sequenzähnlichkeiten mit *DUOX1*. (15)

*DUOX2* ist ein Glykoprotein mit 7 Transmembran-Domänen. Es können zwei Abschnitte des Enzyms unterschieden werden: die C-terminale Region, die homolog zu den anderen oben beschriebenen NADPH-Oxidasen ist und der N-terminale Abschnitt, welcher Ähnlichkeiten zu Peroxidasen aufweist. (15)

Die C-terminale Region, welche intrazellulär liegt, weist die Bindungsstellen für das Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und NADPH auf und stellt damit das katalytische Zentrum des Enzyms dar. Die N-terminale Region befindet sich extrazellulär im Follikellumen. Intrazellulär zwischen den ersten beiden Transmembrandomänen liegt eine große Schleife, welche zwei EF-Hand Motive beinhaltet. Daran können Calcium Ionen binden und das Enzym aktivieren (siehe Abbildung 5). (8)



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des *DUOX2* Protein**

*DUOX2* besteht aus 7 Transmembrandomänen, einer Peroxidase-ähnlichen Domäne, einer Bindungsstelle für FAD und NADPH und zwei EF-Hand Domänen. Abkürzungen: Fe: Eisen, H: Wasserstoff, FAD: Flavin-Adenin-Dinukleotid, NADPH: Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

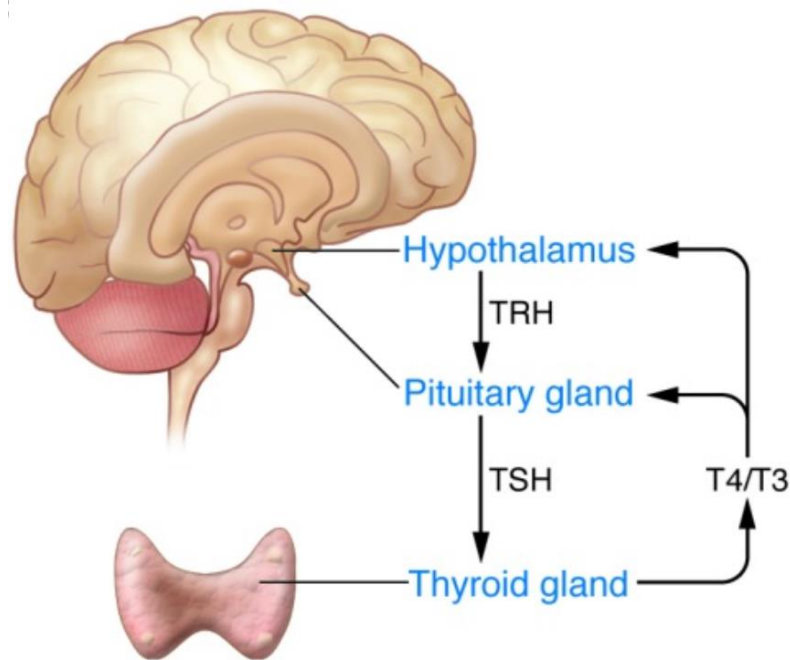
*Bildquelle: modifiziert nach Hajjar C, Cherrier MV, Dias Mirandela G, Petit-Hartlein I, Stasia MJ, Fontecilla-Camps JC, Fieschi F, Dupuy J. 2017. The NOX family of proteins is also present in bacteria. mBio 8:e01487-17.*

Yoshihara et al. zeigten an Schilddrüsenzellen von Ratten, dass die Regulation der Genexpression von *Duox2* und *Duoxa2* vor allem auf Ebene der Transkription erfolgt. Thyreoglobulin supprimiert die Expression der mRNA in Abhängigkeit von der Konzentration und der Zeit: Mit steigenden Konzentrationen an Thyreoglobulin (1 mg/ml bis 30 mg/ml) wurden die gemessenen mRNA Level von *Duox2* und *Duoxa2* immer geringer. Bei einer Thyreoglobulin Konzentration von 10 mg/ml betrug die mRNA Konzentration von *Duox2* bzw. *Duoxa2* beispielsweise nur noch 4% bzw. 1% des Ausgangswertes ohne Thyreoglobulin. Die Suppression begann eine Stunde nach der Stimulation mit Thyreoglobulin, erreichte nach 6 Stunden ihr Maximum und hielt auch nach 72 Stunden noch an. Der Mechanismus hierfür ist eine Suppression des *DUOX2* Promotors. Dadurch waren auch die Protein Level von *DUOX2* sowie die  $H_2O_2$  Produktion in den Zellen reduziert. (16)

TSH hingegen erhöht die Expression der *DUOX2* mRNA (17). Dies geschieht über den cAMP Signalweg: TSH aktiviert die Adenylatcyclase, was zu erhöhten cAMP Konzentrationen und damit zu einer Stimulation des *DUOX2* Promotors führt (17).

## 2.5 Regulation der Hormonfreisetzung

Die Regulation der Freisetzung der Schilddrüsenhormone funktioniert über einen negativen Rückkopplungsmechanismus. Der *nucleus paraventricularis* des Hypothalamus setzt *thyrotropin-releasing-hormone* (TRH) frei. Dieses entsteht aus einem Prä-Pro-Hormon und besteht aus einem Tripeptid, das sich aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Histidin und Prolin zusammensetzt. TRH erreicht über das Hypophysen-Pfortader-System die Adenohypophyse, wo es die Freisetzung von *thyroid-stimulating hormone* (TSH) fördert. Dieses wirkt über den TSH Rezeptor direkt an den Follikelepithelzellen und steigert dadurch die Hormonausschüttung und das Wachstum der Schilddrüse. Im Gegensatz dazu inhibieren die Schilddrüsenhormone T3 und T4 die Sekretion von TRH und TSH (siehe Abbildung 6). (18)



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Regelkreises der Schilddrüsenhormon-Freisetzung**

TRH aus dem Hypothalamus stimuliert die Ausschüttung von TSH aus der Hypophyse. Dieses wiederum führt zu einer vermehrten Freisetzung der Schilddrüsenhormone T3 und T4 aus der Schilddrüse, welche über einen negativen Feedback-Mechanismus die Ausschüttung von TRH und TSH hemmen.

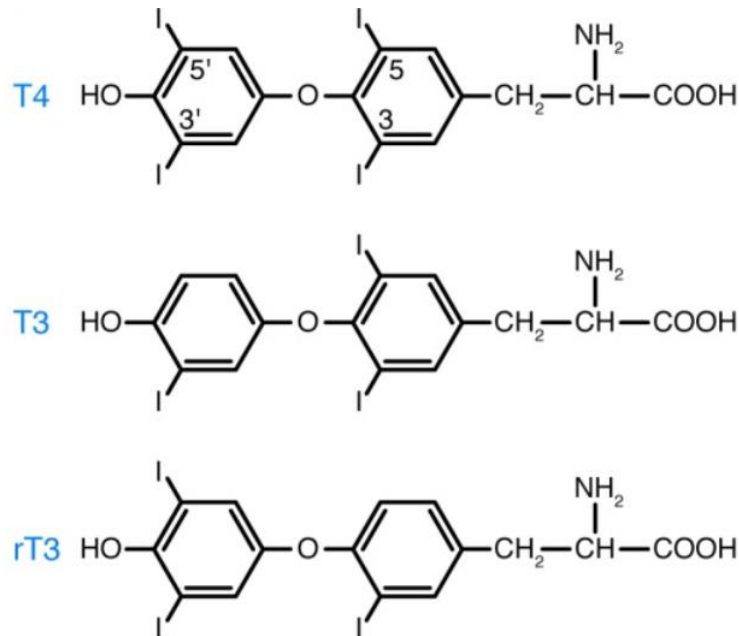
*Bildquelle: modifiziert nach Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. The Journal of Clinical Investigation. 2012;122(9):3035-43.*

## 2.6 Wirkung der Schilddrüsenhormone

Im Blut werden die Schilddrüsenhormone vor allem proteingebunden an Thyroxin-bindendes Globulin, Transthyretin und Albumin transportiert. Nur ein geringer Anteil der Hormone liegt frei und damit biologisch aktiv vor. Diese können über verschiedene Transporter in die Zielzelle aufgenommen werden. (18)

In der Schilddrüse wird vor allem das Prohormon T4 synthetisiert. Das aktive Hormon T3 entsteht aus T4 durch eine Dejodierung des äußeren Rings von T4 (siehe Abbildung 7). T3 bindet mit einer 10-fach höheren Affinität an die Schilddrüsenhormonrezeptoren als T4 und ist somit potenter. Diese Umwandlung erfolgt zum einen durch die Dejodase Typ 1, die in der Leber und Niere lokalisiert ist und zirkulierendes T4 zu T3 umwandelt. Die Schilddrüse, das Gehirn und das braune Fettgewebe exprimieren die Dejodase Typ 2, welche eine höhere Affinität zu T4

aufweist. Diese Gewebe können T4 dadurch auch intrazellulär zu T3 umwandeln. Durch die zellspezifische Expression der Dejodasen wird reguliert, in welchem Gewebe wie viel wirksames T3 vorhanden ist. Die Dejodase Typ 3 wandelt T4 in die inaktive Form des Hormons, reverses T3 (rT3), um (siehe Abbildung 7). Dadurch erfolgt eine Regulation der Konzentration an T3 im Gewebe. (18, 19)



**Abbildung 7: Chemische Struktur der Schilddrüsenhormone T3, T4 und rT3**

*Bildquelle: Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. The Journal of Clinical Investigation. 2012;122(9):3035-43.*

Schilddrüsenhormonrezeptoren gehören zur Familie der nukleären Rezeptoren und stellen Liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren dar. Sie besitzen eine carboxyterminale Domäne, an welche T3 binden kann, sowie eine zentrale Domäne, welche mit *thyroid hormone response elements* (TRE) interagieren kann. TREs stellen DNA-Abschnitte in den Promotoren der Gene dar, deren Expression durch Schilddrüsenhormone reguliert wird. Dazu gehören zum Beispiel die Phenylalanin-Hydroxylase und die Argininosuccinat-Synthase. (19)

Ohne T3 bildet der Schilddrüsenhormonrezeptor einen Komplex mit *retinoid X receptor* (RXR), welcher anschließend an TRE und dann an verschiedene Corepressoren (wie zum Beispiel *nuclear receptor corepressor* (NcoR)) bindet. So wird die Expression von Genen, die durch T3 positiv reguliert werden, reprimiert. Bindet T3 an den Schilddrüsenhormonrezeptor, ändert sich die Konformation der carboxyterminalen Helix 12. Dadurch wird die Bindung zu den Corepressoren

inhibiert und es lagern sich bevorzugt Coaktivatoren (wie *steroid receptor coactivator-1* (SRC-1)) an. Dies führt zur Rekrutierung der Polymerase 2 und damit zur Genexpression. (4)

Die Schilddrüsenhormone spielen in der geistigen und körperlichen Entwicklung des Menschen eine entscheidende Rolle. Sie bewirken eine Differenzierung der verschiedenen Gewebe sowie eine Gewichtszunahme und ein Wachstum der Knochen und des Weichteilgewebes. (20)

Vor allem das zentrale Nervensystem ist in seiner Entwicklung sehr stark auf eine ausreichende Versorgung mit Schilddrüsenhormonen angewiesen. Bei einer Schilddrüsenhormondefizienz kommt es zu Defekten bei der Proliferation und Migration der Vorläuferzellen von Neuronen und die Entwicklung der Axone und Dendriten ist gestört. Hierdurch resultieren eine verminderte Breite des Kortex und Dysplasien. (21)

In der Lunge sind die Schilddrüsenhormone für die Produktion von Surfactant Factor von Bedeutung. Dadurch wird die Belüftung der Lunge und der Gasaustausch nach der Geburt ermöglicht. (20)

Am Herzen bewirken sie die Differenzierung und ein Wachstum der Kardiomyozyten. Sie steigern dort unter anderem die Expression von kontraktilen Elementen, Ionenkanälen und beta-Adrenorezeptoren. (20)

Schilddrüsenhormone sind außerdem für das normale Knochenwachstum essentiell und steigern über eine Stimulation der Osteoblasten und Osteoklasten den Knochenstoffwechsel (22). Im Fettgewebe sind die Schilddrüsenhormone für die Entwicklung und Funktion der braunen und weißen Fettzellen verantwortlich, indem sie beispielsweise die Differenzierung von Prä-Adipozyten in reife weiße Adipozyten induzieren (22).

Eine Unterversorgung des Körpers mit Schilddrüsenhormonen wird als Hypothyreose bezeichnet. In der Mehrzahl der Fälle ist diese erworben, die häufigsten Ursachen sind dabei die Autoimmunthyreoiditis Hashimoto und ein Jodmangel. Bei Erwachsenen sind typische Symptome eine Gewichtszunahme, Kälteintoleranz, Müdigkeit und Antriebslosigkeit. Eine Unterfunktion der Schilddrüse kann auch angeboren sein, was als kongenitale Hypothyreose bezeichnet wird. (23)

## 2.7 Kongenitale Hypothyreose

Eine kongenitale Hypothyreose zeichnet sich durch einen zu niedrigen Serumspiegel von Schilddrüsenhormonen bei oder nach der Geburt aus. Obwohl dieser Mangel auch schon *in utero* besteht, sind über 90% der Neugeborenen zunächst asymptomatisch. Die Symptome entwickeln sich erst im Laufe der ersten Wochen und die Kinder fallen durch eine prolongierte Gelbsucht, Trinkschwäche, Lethargie, Makroglossie und eine große hintere Fontanelle auf. (6)

In den Industriestaaten wird ein Neugeborenenenscreening auf die angeborene Hypothyreose durchgeführt. Hierfür wird meist die TSH Konzentration in getrockneten Vollblutproben bestimmt, welche bei einer Hypothyreose erhöht ist. In Deutschland wird normalerweise ab einem TSH Wert von über 15-25 mU/L der Verdacht auf eine kongenitale Hypothyreose ausgesprochen. Da die TSH Werte während und kurz nach der Geburt physiologischerweise erhöht sind, wird das Screening erst am 3. bis 4. Tag postnatal durchgeführt. So kann die Prävalenz falsch positiver Befunde reduziert werden. (24)

Der Verdacht wird anschließend durch eine Bestimmung von TSH, fT3 und fT4 in Serumblutproben bestätigt, wobei fT3 und fT4 bei einer Hypothyreose erniedrigt sind. Außerdem können bildgebende Verfahren wie eine Sonographie durchgeführt werden, um eine mögliche Schilddrüsenanlagestörung zu erkennen, die in ungefähr 80% der Fälle Ursache der kongenitalen Hypothyreose ist (siehe unten). Laborchemisch kann zusätzlich der Thyreoglobulinspiegel bestimmt werden. Ist dieser messbar, deutet dies auf eine vorhandene Schilddrüse hin. (24)

Bestätigt sich der Verdacht einer kongenitale Hypothyreose, sollte unverzüglich eine Therapie mit L-Thyroxin begonnen werden. Dadurch kann bei der großen Mehrheit der betroffenen Kinder eine altersgerechte neurologische Entwicklung mit normwertigen Intelligenzwerten und ein physiologisches Wachstum erreicht werden. Besonders wichtig für den Erfolg der Therapie ist ein sofortiger Beginn und eine ausreichende Dosierung von L-Thyroxin. Die Substitution sollte so gewählt werden, dass der T4-Spiegel im oberen Normbereich des jeweiligen Lebensalters liegt. (24, 25)

Eine unbehandelte kongenitale Hypothyreose führt zu Kretinismus, welcher mit einer irreversiblen Dysfunktion des Gehirns mit Intelligenzminderung und Kleinwuchs einhergeht. (7)

Eine angeborene Hypothyreose tritt mit einer Inzidenz von 1:3500 Neugeborenen auf. Die häufigste Ursache ist mit 80% eine gestörte Schilddrüsenentwicklung. Diese kann zu einem kompletten Fehlen (Athyreose), einer zu kleinen (Hypoplasie) oder einer abnorm lokalisierten Schilddrüse (Ektopie) führen. Es wurden teilweise Mutationen in den Genen, die für Proteine kodieren, die für die Schilddrüsenanlage wichtig sind, nachgewiesen (NK2 homeobox 1 (*NKX2.1*), NK2 homeobox 5 (*NKX2.5*), forkhead box E1 (*FOXE1*), Paired-Box-Protein 8 (*PAX8*) und TSH-Rezeptor). In den meisten Fällen gelingt es aber nicht, die molekularen Mechanismen, die zu einer Schilddrüsenanlagestörung führen, zu identifizieren. (1, 6)

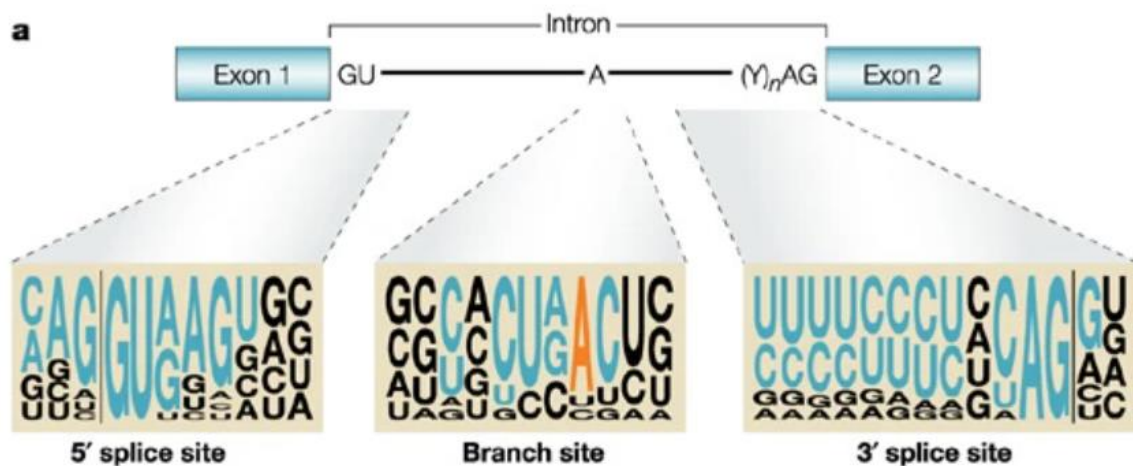
In 15-20% der Fälle einer kongenitalen Hypothyreose besteht eine Störung der Schilddrüsenhormonbiosynthese (siehe 2.3). Hier sind die genetischen Defekte meistens bekannt und betreffen Proteine, die an der Synthese der Schilddrüsenhormone beteiligt sind. Sie werden in der Regel autosomal-rezessiv vererbt. Die betroffenen Neugeborenen zeigen eine normal entwickelte Schilddrüse, welche bei der Geburt vergrößert sein kann. (1)

In seltenen Fällen kommen angeborene zentrale Hypothyreosen vor. Diese beruhen meist auf einer hypothalamisch-hypophysären Entwicklungsstörung, seltener auf einem isolierten TSH Mangel. (24)

Störungen der Schilddrüsenhormonbiosynthese werden durch Mutationen in den entsprechenden Genen ausgelöst (siehe 2.3). Klassischerweise werden solche Punktmutationen in codierenden Sequenzen der DNA einer Änderung der Aminosäuresequenz und damit einem Funktionsverlust des Proteins zugeordnet. Allerdings gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass bis zu 50% der Punktmutationen, die genetische Krankheiten verursachen, auf Störungen des Spleißens der prä-mRNA zurückzuführen sind (26, 27).

## 2.8 Spleißen

In einem menschlichen Gen finden sich sowohl codierende Abschnitte (Exons), als auch nicht codierende Abschnitte (Introns). Aus der durch die Transkription entstandenen prä-mRNA werden deshalb die Introns entfernt und die Exons miteinander verbunden. Die Grenzen zwischen Exon und Intron werden durch konservierte Sequenzen markiert. An der 5'-Spleißstelle stellt  ${}^C/AAGIGU^A/GAGU$  und an der 3'-Spleißstelle eine pyrimidinreiche Sequenz gefolgt von  $AGIG$  die klassische Erkennungssequenz dar (siehe Abbildung 8). Innerhalb des Introns existiert eine konservierte Region, die als Verzweigungsstelle (=branch site) bezeichnet wird und ein Adenosin enthält (siehe Abbildung 8). (26)



**Abbildung 8: Konservierte Sequenzen an den Spleißstellen und der Verzweigungsstelle**

Die oben beschriebenen klassischen Erkennungssequenzen der Spleißstellen sind in blau dargestellt. Nukleotide, die alternativ vorkommen, sind in schwarz dargestellt. Die Größe der Buchstaben repräsentiert jeweils die Frequenz, mit der das Nukleotid an dieser Stelle vorkommt. Das in Rot markierte A stellt das für die Verzweigungsstelle wichtige Adenosin dar. Die schwarzen senkrechten Linien beschreiben die Exon-Intron-Grenzen.

*Bildquelle: Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. Nature reviews Genetics. 2002;3(4):285-98*



Der Prozess des Spleißens besteht aus zwei Umesterungsreaktionen. Im ersten Schritt (branching) greift die freie 2'-OH-Gruppe des Adenosins der Verzweigungsstelle die Phosphodiesterbindung des Guanosins an der 5'-Spleißstelle an. Dadurch entsteht an der 5'-Spleißstelle ein Bruch im RNA-Strang und es bildet sich eine Lasso-Struktur (lariat) mit einer neu entstandenen 2'-5'-Phosphodiesterbindung an der Verzweigungsstelle. In einer zweiten Reaktion (ligation) greift das nun freie 3'-OH-Ende des letzten Exon-Nukleotids die Phosphatgruppe der 3'-Spleißstelle an. So werden die beiden Exons miteinander verknüpft und das Intron wird frei. (28)

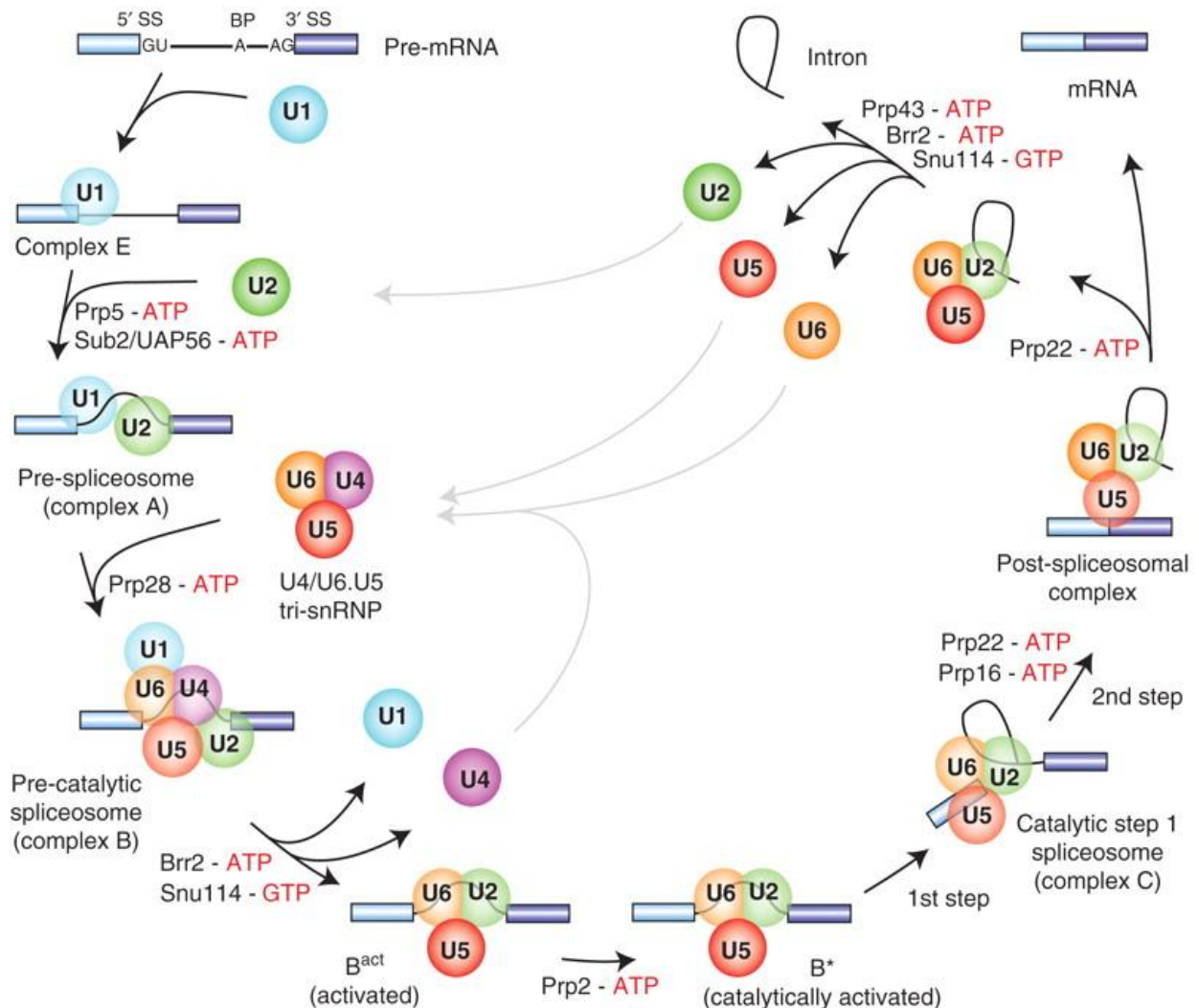
In höheren Eukaryoten wird für das Spleißen das Spleißosom, ein Ribonukleoproteinkomplex, benötigt. Dieses enthält Uridin-reiche kleine RNA-Moleküle (*small nuclear RNAs*, snRNAs), welche zusammen mit den Proteinen als *small nuclear ribonucleoproteins* (snRNPs) bezeichnet werden. (28)

Der Aufbau des Spleißosoms umfasst folgende Schritte (siehe Abbildung 9): Zuerst lagert sich das U1-snRNP an die 5'-Spleißstelle des Exons an. Dies geschieht über eine Basenpaarung zwischen der U1-snRNA und der entsprechenden Sequenz auf der prä-mRNA (29). Außerdem wird die Verzweigungsstelle durch SF1 sowie die 3'-Spleißstelle durch U2AF (*auxiliary factor*) gebunden. So entsteht der Komplex E (*early spliceosome*). Nun ersetzt U2-snRNP den SF1, erkennt die Verzweigungsstelle und es entsteht der Komplex A (*pre-spliceosome*). Danach binden U4-, U5- und U6-snRNPs, wodurch der Komplex B, das präkatalytische Spleißosom, entsteht. Anschließend lösen sich U1- und U4-snRNP und der nun entstandene Komplex wird als aktiviertes Spleißosom (B<sup>act</sup> Komplex) bezeichnet. (30)

Durch eine katalytische Aktivierung reift dieser zu Komplex B\*, in welchem nun die erste Umesterungsreaktion stattfindet (s.o.). Das daraus resultierende Spleißosom wird als Komplex C bezeichnet und wird in einem weiteren Schritt katalytisch aktiviert. Im Komplex C\* findet nun die zweite Umesterungsreaktion statt (s.o.). Nun wird das ligierte Exon sowie das entstandene Intron-Lariat freigesetzt und der Komplex zerfällt in die einzelnen snRNPs. (28)

Die Konversion zwischen den verschiedenen Spleiß-Komplexen wird durch 8 RNA-abhängige ATPasen (Prp5, Sub2/UAP56, Prp28, Brr2, Prp2, Prp16, Prp22, Prp43)

und durch die GTPase Snu114 erleichtert. Sie liefern durch die Hydrolyse von ATP bzw. GTP die nötige Energie für die Konformationsänderungen der Komplexe. (31)



**Abbildung 9: Bildung und Abbau der einzelnen Komplexe des Spleißosoms.**

An der Bildung der verschiedenen Komplexe des Spleißosoms sind die snRNPs U1, U2, U4, U5 und U6 sowie die 8 RNA-abhängige ATPasen (Prp5, Sub2/UAP56, Prp28, Brr2, Prp2, Prp16, Prp22, Prp43) und die GTPase Snu114 beteiligt. Am Schluss wird das ligierte Exon sowie das Intron freigesetzt und der Komplex zerfällt in die einzelnen snRNPs. Exons werden als Boxen und Introns als Linien dargestellt. Abkürzungen: SS: Spleißstelle, BP: *branch point* = Verzweigungsstelle, snRNP: *small nuclear ribonucleoproteins*

*Bildquelle: Will CL, Luhrmann R. Spliceosome structure and function. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2011;3(7).*

## 2.9 Die Rolle von Cis-acting elements beim Spleißen

Allein die Basensequenzen der Exon-/Intron-Grenzen und der Verzweigungsstelle reichen aber nicht aus, um eine genaue Erkennung der Spleißstellen zu gewährleisten. Hierfür werden zusätzliche Sequenzen innerhalb der Exons und Introns benötigt. Diese werden als *cis-acting splicing-regulatory elements* (SREs) bezeichnet und können entweder als Enhancer oder Silencer agieren und in Exons oder Introns liegen. Dementsprechend werden sie als *exonic splicing enhancers* (ESEs), *exonic splicing silencers* (ESSs), *intronic splicing silencers* (ISSs) und *intronic splicing enhancers* (ISEs) bezeichnet. (32)

ESEs werden von Serin/Arginin-reichen Proteinen (SR Proteinen) gebunden. Diese besitzen ein RNA-Erkennungsmotiv (*RNA-recognition motif*, RRM), welches für die sequenzspezifische Bindung an das ESE verantwortlich ist, sowie eine carboxyterminale Domäne mit vielen Arginin/Serin-Dipeptiden (RS-Domäne), welche vor allem Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. Die Wirkung des SR Proteins am ESE kann über zwei Mechanismen erfolgen: Zum einen kann die RS-Domäne Kontakt mit dem Spleißfaktor U2AF herstellen und damit den Spleißkomplex rekrutieren. Zum anderen kann das SR-Protein den negativen Effekt eines Inhibitors, der an ein nahegelegenes ESS gebunden hat, antagonisieren. (26)

ESSs hingegen werden vor allem von *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* (hnRNP) gebunden. Diese werden alphabetisch von hnRNP A bis U benannt. Ähnlich wie die SR Proteine tragen auch sie eine RNA-Bindedomäne, durch welche eine spezifische Erkennung der ESS-Sequenzen ermöglicht wird. Ihre Wirkung entfalten sie wahrscheinlich über einen Looping-out-Mechanismus: Die hnRNP Proteine können an beide Enden des entsprechenden Exons binden, sodass das Exon eine Schleife bildet und für das Spleißosom nicht mehr zugänglich ist. Somit wird das gebundene Exon nicht in die reife mRNA integriert. Außerdem könnten hnRNPs das Exon abschirmen, sodass die SR-Proteine nicht mehr an ESEs binden können und ihre Wirkung somit antagonisiert wird. (33)

## 2.10 Spleiß-Mutationen

Spleiß-Mutationen sind Mutationen, die dazu führen, dass Exons und Introns in der prä-mRNA nicht mehr richtig erkannt werden. Folglich entsteht im Vergleich zum Wildtyp eine fehlerhafte reife mRNA. (33)

Wimmer et al. teilt die Spleiß-Mutationen in fünf Kategorien ein. Zur ersten Gruppe gehören Mutationen, die die Exon-Intron-Grenzen betreffen. Dies könnte zur Folge haben, dass das nachfolgende Exon nicht mehr erkannt wird und damit während des Spleiß-Prozesses übersprungen wird. Die zweite Kategorie umfasst Mutationen in Introns, die zur Entstehung einer neuen Spleiß-Stelle und somit zur Integration von Intron-Sequenzen in die reife mRNA führt. Typ 3 Spleiß-Mutationen liegen in Exons und führen dort zur Entstehung einer neuen Spleiß-Stelle. Dadurch gehen Teile dieses Exons während des Spleißens verloren. Die vierte Gruppe umfasst, ähnlich wie Gruppe 1, Mutationen, die die Exon-Intron-Grenzen verändern. Dies führt aber zur Aktivierung kryptischer Spleiß-Stellen innerhalb eines Exons oder Introns. Dadurch wird die Basensequenz der reifen mRNA verändert. Die fünfte Kategorie beinhaltet Mutationen, die zur Veränderung von regulatorischen Sequenzen innerhalb des Exons führen. Hier wäre denkbar, dass ein ESE gestört wird oder ein neues ESS entsteht. Beides könnte zum Überspringen des Exons führen. (34)

Mutationen aller fünf Kategorien führen zu einer veränderten reifen mRNA und können somit in einem stark veränderten Protein resultieren. Wird beispielsweise ein Exon während des Spleißens übersprungen (fünfte Kategorie), kann die Deletion in der reifen mRNA zu einer Verschiebung des offenen Leserasters führen. Diese Mutationen werden als *frameshift* Mutationen bezeichnet und es entsteht eine völlig andere Aminosäuresequenz. Außerdem könnte durch den *frameshift* ein vorzeitiges Stopcodon entstehen und das Protein wäre dadurch verkürzt. Der menschliche Körper besitzt allerdings ein Kontrollsystem, durch welches mRNA mit einem vorzeitigen Stopcodon erkannt und abgebaut werden. Dieser Prozess wird als *nonsense mediated decay* bezeichnet und soll verhindern, dass fehlerhafte Proteine produziert werden. (33)

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Vorstellung der Patientin A**

Die Patientin wurde im Oktober 2004 geboren. Sowohl die Schwangerschaft wie auch die Geburt in der 40. Schwangerschaftswoche (SSW) verliefen unauffällig. Das Geburtsgewicht betrug 2715 g, sie war 49 cm lang, hatte einen Kopfumfang von 35,5 cm und einen Apgar-Score von 10/10 Punkten. Ihr Gewicht lag somit auf der 10. Perzentile und ihre Größe auf der 18. Perzentile.

Beim Neugeborenencreening am 3. postnatalen Tag fielen erhöhte TSH Werte ( $>250 \mu\text{U/ml}$ ) auf, weshalb eine stationäre Einweisung erfolgte. Die körperliche Untersuchung des dann 14 Tage alten Mädchens zeigte einen guten Allgemein- und Ernährungszustand. Herz, Lungen und Abdomen waren unauffällig. Der TSH-Wert betrug bei Aufnahme  $154,6 \mu\text{U/ml}$  (Referenzwert:  $0,7-11,0 \mu\text{U/ml}$ ), der fT3-Wert lag bei  $2,30 \text{ pg/ml}$  (Referenzwert:  $2,24-5,40 \text{ pg/ml}$ ) und der fT4-Wert bei  $0,41 \text{ ng/dl}$  (Referenzwert:  $1,50-2,59 \text{ ng/dl}$ ). Somit wurde eine hypothyreote Stoffwechsellage bestätigt und eine Therapie mit  $50 \mu\text{g}$  L-Thyroxin täglich eingeleitet. Zur weiteren Diagnostik wurde eine Sonographie der Schilddrüse durchgeführt, welche eine orthotope Lage und ein altersentsprechendes Gesamtvolumen von ca.  $0,9 \text{ ml}$  ergab. Ein Screening der Mutter auf Schilddrüsenautoantikörper fiel negativ aus. Außerdem wurde eine Hörtestung durchgeführt, welche unauffällig war. Das Röntgen des linken Beines ergab ein Knochenalter der 32. SSW. In der Familie waren keine Schilddrüsenerkrankungen bekannt, lediglich der Großvater mütterlicherseits habe aus unbekanntem Grund eine Schilddrüsenoperation gehabt.

Im Verlauf zeigte die Patientin unter der Behandlung mit L-Thyroxin eine physiologische Entwicklung ohne Auffälligkeiten des Schlafverhaltens, der Ernährung, der Stuhlanamnese oder des Hörens. Ambulant erfolgten regelmäßige Kontrollen der Schilddrüsenparameter und eine entsprechende Anpassung der L-Thyroxin-Dosis. Bereits nach Vollendung des ersten Lebensmonats erfolgte eine Dosisreduktion auf  $37,5 \mu\text{g}$  L-Thyroxin täglich. Im Alter von 10 Monaten wurde die Dosis erneut auf  $25 \mu\text{g}$  pro Tag reduziert. Mit 13 Jahren wurde die Dosis wieder auf  $37,5 \mu\text{g}$  täglich angehoben. Einen detaillierten Verlauf der Schilddrüsenwerte sowie der Dosierungen der L-Thyroxin Medikation sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1: Verlauf der Schilddrüsenwerte sowie verordnete L-Thyroxin-Dosen bei der Patientin A**

Alter Patientin	TSH $\mu\text{U/ml}$	fT3 $\text{pg/ml}$	fT4 $\text{ng/dl}$	L-Thyroxin-Dosis ( $\mu\text{g/d}$ )	Bemerkung
14 Tage	154,6	2,30	0,41	-	Beginn der L-Thyroxin Therapie mit 50 $\mu\text{g/d}$
19 Tage	81,32	4,2	0,82	50	
22 Tage	6,72	4,26	1,88	50	
1 Monat	0,19	6,1	2,83	50	Reduktion der L-Thyroxin Therapie auf 37,5 $\mu\text{g/d}$
1,5 Monate	0,75	4,4	1,54	37,5	
2 Monate	1,73	4,1	1,79	37,5	
5 Monate	1,78	4,5	2,02	37,5	
8 Monate	1,92	4,1	2,20	37,5	
10 Monate	1,33	4,6	1,86	37,5	Reduktion der L-Thyroxin Therapie auf 25 $\mu\text{g/d}$
15 Monate	2,49	4,6	1,55	25	
Ambulante Betreuung durch Kinderärzte: alle 6 Monate Kontrolle der Schilddrüsenwerte, immer euthyreote Stoffwechsellage bei einer Therapie mit 25 $\mu\text{g}$ L-Thyroxin pro Tag					
8,5 Jahre	3,48	3,74	1,27	25	
10 Jahre	1,78	3,77	1,24	25	
11 Jahre	2,44	3,32	1,22	25	
12 Jahre	3,11	3,41	0,92	25	Dosisanpassung auf 37,5 $\mu\text{g/d}$
13 Jahre	1,75	3,29	1,10	37,5	

Aufgrund der pathologischen Schilddrüsenwerte der Patientin direkt nach der Geburt wurde eine primäre kongenitale Hypothyreose diagnostiziert. Nach dem Ausschluss anderer Auslöser wie z.B. blockierende TSH-Rezeptor-Antikörper oder Jodmangel während der Schwangerschaft, kamen als Ursache für die Hypothyreose Fehler in der Schilddrüsenanlage und Hormonsynthesestörungen in Frage (siehe 2.7). Die bei dieser Patientin unauffällige Größe und Position der Schilddrüse sprachen gegen eine fehlerhafte Schilddrüsenanlage. Aufgrunddessen bestand bei dieser Patientin der Verdacht auf eine Störung der Schilddrüsenhormonsynthese. Nachdem die Eltern der Patientin ihr schriftliches Einverständnis zur molekularen Analyse gegeben hatten, wurden in unserem Labor die bis dato bekannten Kandidatengene sequenziert.

### **3.2 Vorstellung der Patientin B**

Die Patientin wurde im März 2005 geboren. Bei der Geburt fiel ein stark erhöhter TSH-Wert auf ( $>150 \mu\text{U/ml}$  (Referenzwert:  $0,7-11,0 \mu\text{U/ml}$ )). Der  $\text{fT}_4$ -Wert lag bei  $0,31 \text{ ng/dl}$  (Referenzwert:  $1,50-2,59 \text{ ng/dl}$ ) und der Thyreoglobulinwert war mit  $1990 \text{ ng/ml}$  massiv erhöht. Sonographisch war die Schilddrüse normal angelegt, etwas vergrößert und mit homogenem Parenchym. Ein Hörtest fiel unauffällig aus. In der Familienanamnese fand sich eine einjährige Einnahme von L-Thyroxin und Kaliumiodid durch die Mutter im Alter von 15 Jahren, welche danach aufgrund einer euthyreoten Stoffwechsellaage und Symptombefreiheit abgesetzt wurde. Der Vater und die Mutter zeigten zum Zeitpunkt der Geburt der Patientin euthyreote Schilddrüsenwerte. Der zwei Jahre ältere Bruder wies keine schilddrüsen-spezifischen Symptome auf, bei ihm erfolgte keine Labordiagnostik.

Bei der Patientin B wurde ebenfalls die Diagnose einer primären kongenitalen Hypothyreose gestellt. Auch bei ihr wurden nach dem schriftlichen Einverständnis der Eltern die Kandidatengene der Schilddrüsenhormonsynthesestörung sequenziert. Eine Therapie mit  $25 \mu\text{g}$  L-Thyroxin täglich wurde eingeleitet. Darunter zeigte sie ein perzentilengerechtes Wachstum und Gewichtszunahme. Der körperliche Untersuchungsbefund war jederzeit unauffällig. Im Alter von 24 Monaten wurde die Dosis von L-Thyroxin sukzessive reduziert und nach 2 Monaten vollständig abgesetzt. Nachfolgend zeigten sich euthyreote Schilddrüsenparameter sowie keine

Symptome einer Hypothyreose. Die Einnahme von L-Thyroxin wurde daraufhin beendet.

**Tabelle 2: Verlauf der Schilddrüsenwerte sowie verordnete L-Thyroxin-Dosen bei der Patientin B**

Alter Patientin	TSH μU/ml	fT3 pg/ml	fT4 ng/dl	L-Thyroxin-Dosis (μg/d)	Bemerkung
	>150		0,31	-	Thyreoglobulin 1990 ng/ml Beginn der L-Thyroxin Therapie mit 25 μg/d
12 Monate	2,29	3,7	1,32	25	
22 Monate	2,18		1,17	25	
24 Monate				25	Sukzessive Dosisreduktion L-Thyroxin
26 Monate	2,9	4,3	1,3	-	Absetzen L-Thyroxin
27 Monate	6,0	4,3	1,3	-	
29 Monate	2,18		1,21		

### 3.3 Im Vorfeld der Arbeit erfolgte *in vitro* Analysen

#### 3.3.1 Sequenzierung der Kandidatengene der kongenitalen Hypothyreose

Im Labor der AG Pohlentz erfolgte bei beiden Patientinnen sowie deren Familienangehörigen die Sequenzierung der bis dato bekannten Kandidatengene der Schilddrüsenhormonsynthesestörung: Thyreoperoxidase (*TPO*), Duale Oxidase 2 (*DUOX2*) und deren Reifungsfaktor (*DUOXA2*), Thyreoglobulin (*TG*), Pendrin (*SLC26A4*), Natrium-Jodid-Symporter (*NIS*, *SLC5A5*) und Dehalogenase 1 (*DEHAL1*, *IYD*). Die Sequenzierung erfolgte durch kapillarelektrophoretische Auftrennung mithilfe des 3130 Avant Genetic Analysers (Applied Biosystems, Weiterstadt Deutschland).



Sie beruht auf der Didesoxymethode nach Sanger. Der zu sequenzierende DNA Abschnitt wird ausgehend von Primern in einer PCR Reaktion amplifiziert. Hinzugegebene fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP) führen allerdings teilweise zum Strangabbruch, wodurch verschieden lange DNA Fragmente entstehen, die mit einer fluoreszenzmarkierten ddNTP enden. Durch kapillarelektrophoretische Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe und Detektion der am Ende stehenden fluoreszenzmarkierten ddNTP über einen Laser kann die Sequenz abgelesen werden. (35) Mithilfe der Software Sequencher 5.1 von GeneCodes Corporation (Ann Arbor, Michigan, USA) wurden die Elektropherogramme graphisch dargestellt und analysiert.

### **3.3.2 Isolation und Sequenzierung der RNA aus Lymphozyten der Patientin**

Zur Untersuchung, ob die Mutation c.602dup das Spleißen verändert, wurde im Labor der AG Pohlenz im Vorfeld dieser Arbeit RNA aus Lymphozyten der Patientin isoliert (2). Diese wurde mithilfe einer reversen Transkription und DUOX2 spezifischen Primern in cDNA umgeschrieben, anschließend erfolgte die Sequenzierung der cDNA wie unter 3.2.1 beschrieben (2).

### **3.3.3 Analyse des Spleißverhaltens durch transiente Transfektion von HeLa Zellen**

Zur Bestätigung der Beobachtung, dass die Mutation c.602dup das Spleißen verändert, wurden im Labor „Molekulare Pädiatrische Endokrinologie“ der AG Pohlenz weitere *in vitro* Untersuchungen durchgeführt.

Hierfür wurde der mutationstragende Genabschnitt (Exon 5- Exon 7) des *DUOX2* Gens durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Durch einen Restriktionsverdau mit *BamHI* und *XhoI* und anschließender Ligation wurde das PCR Produkt in den Spleißvektor RHCglo eingefügt. Nun wurde das rekombinante Plasmid mittels Transformation in chemisch kompetente Bakterienzellen überführt, wo es zu einer Amplifikation des Plasmids kam. Anschließend wurde die Plasmid-DNA isoliert, aufgereinigt und sequenziert, um sicherzustellen, dass der mutationstragende Genabschnitt vollständig im Plasmid enthalten ist. Daraufhin erfolgte eine transiente Transfektion in eukaryotische HeLa-Zellen, wo die Transkription der rekombinanten Plasmid-DNA vonstatten ging. Die RNA wurde

daraufhin isoliert, mithilfe einer RT-PCR mit vektorspezifischen Primern in cDNA umgeschrieben und abschließend sequenziert. So wurde analysiert, ob die Mutation c.602 dup das Spleißverhalten im Vergleich zur Wildtyp Sequenz verändert.

### **3.4 *In silico* Analysen der Mutationen c.602dup und c.1516G>A**

#### **3.4.1 Einfluss der Mutation c.602 dup auf das Spleißverhalten**

Zur *in silico* Analyse, ob die Mutation c.602dup das Spleißen verändert, wurde das Vorhersageprogramm Ex-Skip verwendet (36). Dieses vergleicht die vorhandenen Exonic Splicing Enhancer (ESE) und Exonic Splicing Silencer (ESS) der Wildtyp und der mutierten Sequenz und berechnet daraus die Wahrscheinlichkeit für das Überspringen des jeweiligen Exons im Spleißprozess (36).

Die Sequenzen der miteinberechneten ESEs und ESSs stammen aus verschiedenen Studien: Zhang und Chasin beschrieben *Putative exonic enhancers* (PESEs) und *putative exonic silencers* (PESSs) (37), Wang et al. *fluorescence-activated screen for exonic splicing silencers* (FAS-ESSs) (38), Fairbrother et al. RESCUE-ESEs (39, 40), Stadler et al. *neighborhood inference* ESEs und ESSs (NI-ESEs/ NI-ESSs) (41) und Zhang et al. *exon/intron identity elements* (EIEs/ IIEs) (42). Hierfür wurden das Exon 6 sowie die angrenzenden intronischen Sequenzen analysiert. Die Ergebnisse sind unter 4.4 dargestellt.

#### **3.4.2 Mögliche Ursachen einer Veränderung des Spleißens durch die Mutation c.602dup**

Mithilfe des Programms SpliceAid wurde untersucht, welche Faktoren für das veränderte Spleißen verantwortlich sind. Dies könnte aufgrund zusätzlicher ESSs bzw. wegfallender ESEs entstehen (siehe 2.9). Das Programm SpliceAid setzt sich aus einer Datenbank zusammen, welche RNA Sequenzen beinhaltet, die im menschlichen Körper von Spleiß-Proteinen gebunden werden. Durch den Vergleich der bindenden Proteine an die Wildtyp und die mutierte Sequenz kann daher möglicherweise *in silico* eine Aussage getroffen werden, warum die Mutation zu einem veränderten Spleißen führt. Hier wurde der Abschnitt von Exon 5 bis einschließlich Exon 7 des *DUOX2* Gens analysiert.

### **3.4.3 Auswirkungen der Mutationen c.602dup und c.1516G>A auf die Aminosäuresequenz**

Um zu untersuchen, welche Auswirkungen die Mutationen (c.602dup, c.1516G>A) auf die Proteinsequenz haben könnten, wurde das Programm Translate von ExPASy Bioinformatics Resource Portal verwendet (43). Es übersetzt eine Nukleotidsequenz in eine Aminosäuresequenz und gibt dabei mögliche Leseraster an. Zuerst wurden die Sequenzen der Exone des *DUOX2* Wildtyps in eine Aminosäuresequenz übersetzt. Das Leseraster wurde so gewählt, dass das entstehende Protein, hinsichtlich der Anzahl der Aminosäuren, dem in der Literatur beschriebenen entspricht (siehe 2.4) (15). Anschließend wurde die Basensequenz des c.602dup mutierten *DUOX2* analysiert. Das Ergebnis dieser *in silico* Analysen findet sich unter 4.6. Zum Schluss wurde die Aminosäuresequenz des c.1516G>A mutierten *DUOX2* analysiert und unter 4.8 dargestellt.

### **3.4.4 Auswirkungen der Mutationen c.602dup und c.1516G>A auf die Proteinstruktur**

Nachdem die Aminosäuresequenzen des *DUOX2* Wildtyp Proteins, der Frameshift-Mutation sowie der Spleißmutation durch das Programm „translate“ von ExPASy ermittelt wurden, stellte sich nun die Frage, welche Anteile des Proteins durch die Mutation verändert sind.

Hierfür wurde das Programm „prosite“ von ExPASy verwendet. Prosite stellt eine Datenbank für Proteinfamilien und Domänen dar. Es analysiert die eingegebene Aminosäuresequenz auf konservierte Regionen, welche auch in anderen Proteinen vorkommen. Diese Regionen sind oft wichtig für die Funktion eines Proteins. (43)

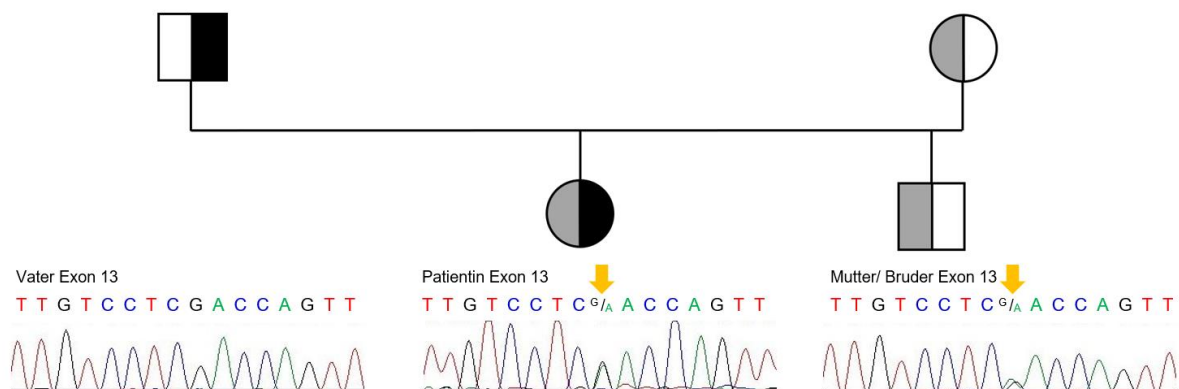
Die Aminosäuresequenzen des Wildtyp *DUOX2* Proteins, der durch Frameshift entstandenen Variante der c.602dup Mutation und der der Spleißmutation wurden einzeln mithilfe des Programms „prosite“ analysiert und graphisch dargestellt. Die Ergebnisse finden sich unter 4.6. Zum Schluss wurde die Mutation c.1516G>A mithilfe „prosite“ untersucht und die Position der Mutation im Protein graphisch dargestellt (siehe 4.7).



## 4.2 Sequenzierung der genomischen DNA der Patientin B, ihrer Mutter, ihres Vaters und ihres Bruders

Die Sequenzierung der Kandidatengene der Schilddrüsenhormonsynthesestörungen bei der Patientin B ergab, dass sie ebenfalls heterozygote Trägerin der Mutation c.602dup im *DUOX2* Gen ist. Außerdem liegt bei ihr die heterozygote Mutation c.1516G>A vor. Im Exon 13 ist die Base Guanin gegen Adenin substituiert. Bei der Patientin besteht folglich eine Compound-Heterozygotie im *DUOX2* Gen. Beide Mutationen (c.602dup, c.1516G>A) konnten in 120 zufällig ausgewählten Blutproben nicht nachgewiesen werden, weshalb ein Polymorphismus unwahrscheinlich ist (2).

Anschließend erfolgte ebenso eine Sequenzierung der Exone 6 und 13 bei den Eltern und dem Bruder der Patientin B. Hieraus ergab sich, dass sie die c.602dup Mutation von ihrem Vater und die c.1516G>A Mutation von ihrer Mutter geerbt hat. Der Bruder ist heterozygot für die Mutation c.1516G>A. Die Ergebnisse der Sequenzierung von Exon 13 sind in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11: Elektropherogramme der Sequenzierung von Exon 13 des *DUOX2* Gens der Patientin B, ihrer Mutter, ihres Vaters und ihres Bruders**

Stammbaum zur vorliegenden *DUOX2* Mutationen der Patientin B (oben) und Elektropherogramme der Sequenzierung von Exon 13 des *DUOX2* Gens (unten). Die Patientin ist compound heterozygote Trägerin der Mutationen c.602dup (schwarzer Halbkreis) und c.1516G>A (grauer Halbkreis) in *DUOX2*. Die Mutter und der Bruder sind heterozygote Träger der Mutation c.1516G>A. Der Vater hingegen trägt diese Mutation nicht, ist aber heterozygot für die Mutation c602dup. Abkürzungen: A: Adenin (grün), G: Guanin (schwarz), T: Thymin (rot), C: Cytosin (blau).

Die bei den Patientinnen A und B identifizierte Mutation c.602dup könnte durch die Duplikation der Base Guanin zu einem Leserahmenfehler führen. Dies würde zu

einem vorzeitigem Stopcodon und einer veränderten Aminosäuresequenz führen (siehe 4.6), woraus ein nicht funktionales Protein resultieren könnte. Außerdem wäre es möglich, dass die Mutation c.602dup Einfluss auf das Spleißen hat. Dies konnte im Labor der AG Pohlenz durch *in vitro* Untersuchungen gezeigt werden (siehe 4.3). Im Rahmen dieser Dissertation soll untersucht werden, welche molekularen Mechanismen für das veränderte Spleißen verantwortlich sind.

### 4.3 Sequenzierung der cDNA zur Analyse des Spleißverhaltens der c.602dup Mutation

Im Labor der AG Pohlenz wurde gezeigt, dass das Spleißen in HeLa Zellen durch die Mutation c.602dup verändert ist. Die *in vitro* gebildete mRNA enthält kein Exon 6 des *DUOX2* Gens (siehe Abbildung 12). Die Duplikation der Base Guanin führt also dazu, dass Exon 6 im Spleißvorgang übersprungen und somit nicht in der reifen mRNA enthalten ist. Das heißt, dass Exon 5 und Exon 7 direkt zusammen gespleißt werden, ohne dass Intronsequenzen durch kryptische Spleißstellen enthalten sind. Die veränderte Basensequenz führt während der Translation zu einer veränderten Proteinsequenz (siehe 4.6).

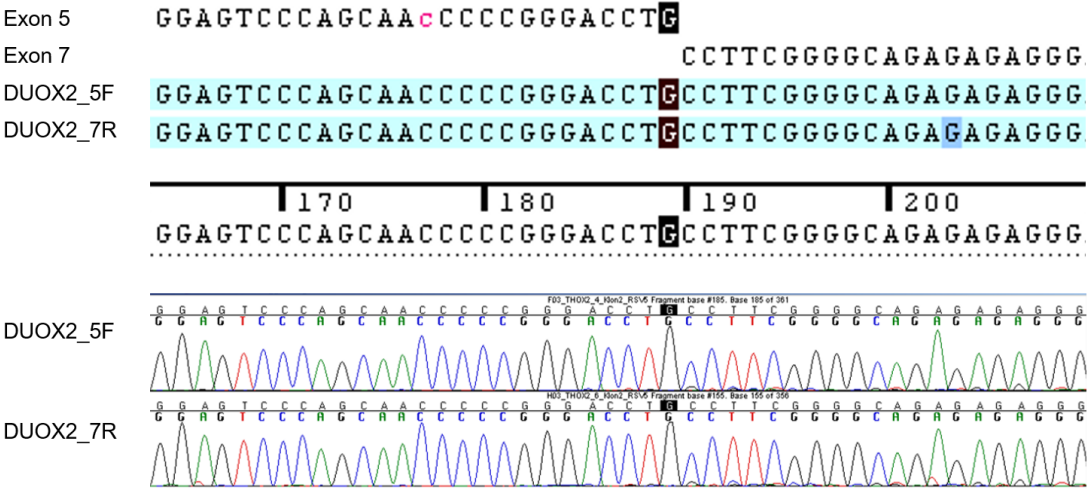


Abbildung 12: Sequenzierung der cDNA

Mithilfe der Sequenzierung der cDNA wurde gezeigt, dass die Mutation c.602dup das Spleißen stört, sodass in der reifen mRNA das Exon 6 fehlt und Exon 7 direkt auf Exon 5 folgt. Die oberste Zeile zeigt die genomische Sequenz von Exon 5, darunter die von Exon 7. In den nächsten beiden Zeilen (DUOX2\_5F und DUOX2\_7R) findet sich das Ergebnis der Sequenzierung der cDNA mithilfe der Sequenzierungsprimer DUOX2\_5F und DUOX2\_7R. Dieses findet sich in der unteren Abbildungshälfte graphisch dargestellt.

Abkürzungen: A: Adenin (grün), G: Guanin (schwarz), T: Thymin (rot), C: Cytosin (blau)

#### 4.4 *In silico* Analyse der Auswirkungen der Mutation c.602dup auf das Spleißverhalten

Für die *in silico* Analyse, ob durch die Mutation c.602dup das Spleißen verändert wird, wurde das Vorhersageprogramm Ex-Skip verwendet (siehe 3.4.1).

Dieses zeigte, dass die mutierte Sequenz im Vergleich zum Wildtyp vier zusätzliche ESSs aufweist, während die Zahl der ESEs gleich bleibt. Das führt zu einer Erhöhung des Quotienten ESS/ESE. Somit wurde eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Überspringen des Exon 6 im Spleißvorgang vorhergesagt (siehe Abbildung 13). Dies würde zu einem veränderten DUOX2 Protein und letztendlich eventuell zu einer Störung der Schilddrüsenhormonbiosynthese führen.

##### EX-SKIP - Results for submitted sequences

Seq	PESS (count)	FAS-ESS hex2 (count)	FAS-ESS hex3 (count)	IIE (count)	IIE (sum)	NI-ESS trusted (count)	NI-ESS all (sum)	PESE (count)	RESCUE -ESE (count)	EIE (count)	EIE (sum)	NI-ESE trusted (count)	NI-ESE all (sum)	ESS (total)	ESE (total)	ESS/ESE (ratio)
seq-wt	0	5	3	31	351.8600	6	-11.1443	10	3	66	722.7419	46	82.5925	45	125	0.36
seq-mut	0	6	4	32	365.6878	7	-12.1443	10	3	66	722.7419	46	82.5925	49	125	0.39

Allele seq-mut has a higher chance of exon skipping than allele seq-wt.

#### Abbildung 13: *In silico* Analyse des Spleißverhaltens der Wildtypsequenz und der mutierten Sequenz des Bereiches Intron 5 bis einschließlich Intron 6 von *DUOX2*

Laut Vorhersageprogramm Ex-Skip beinhaltet die c. 602dup mutierte *DUOX2* Sequenz (seq-mut) im Vergleich zur *DUOX2* Wildtyp Sequenz (seq-wt) vier zusätzliche ESSs (siehe drittletzte Spalte ESS (total)), während die Zahl der ESEs gleich bleibt (siehe zweitletzte Spalte ESE (total)). Somit erhöht sich der Quotient ESS/ESE (siehe letzte Spalte ESS/ESE (ratio)) und es besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Überspringen des Exon 6 im Spleißvorgang.

Bildquelle: erstellt mithilfe von Ex-Skip (<https://ex-skip.img.cas.cz/>)

#### 4.5 Mögliche Ursachen einer Veränderung des Spleißens durch die Mutation c.602dup

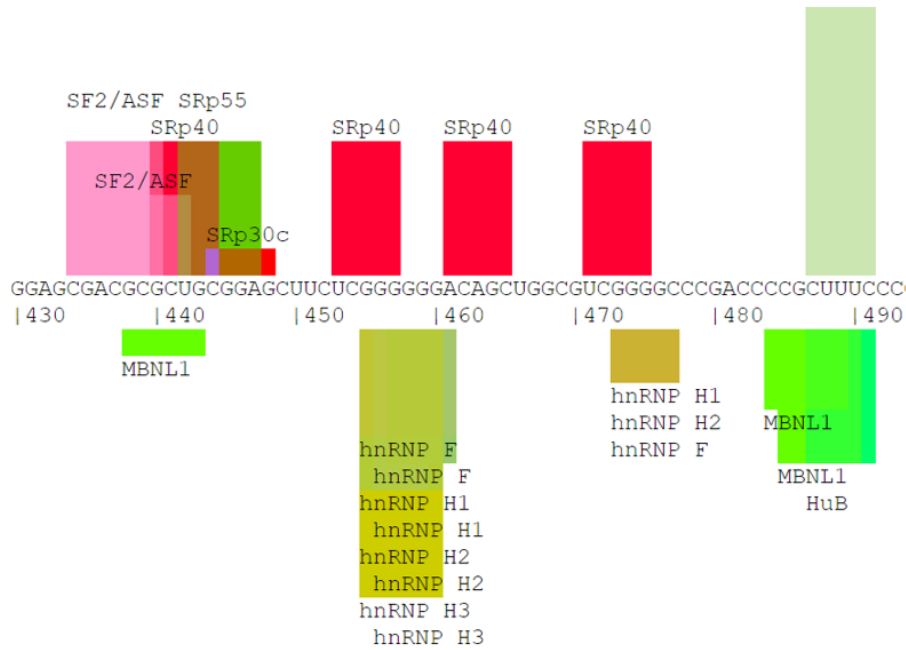
*In vitro* wurde gezeigt, dass die Mutation c.602dup zu einer Veränderung des Spleißens in HeLa Zellen führt (siehe 4.3). Aufgrund der Mutation wird Exon 6 des *DUOX2* Gens herausgespleißt, sodass in der reifen mRNA auf Exon 5 direkt die kodierende Sequenz von Exon 7 folgt. Laut des Vorhersageprogramms Ex-Skip entsteht das veränderte Spleißen durch eine zusätzliche Bindung von ESSs. Mithilfe des Vorhersageprogramms SpliceAid wurde nun analysiert, welche zusätzlichen ESSs an die mutierte *DUOX2* Sequenz im Vergleich zur Wildtyp Sequenz binden (siehe 3.4.2). Alle im Programm enthaltenen Daten wurden experimentell ermittelt. (44)

In der mutierten Sequenz (c.602dup) entstehen bei der Analyse mit dem Programm SpliceAid zusätzliche Bindungsstellen für die Proteine *fragile X mental retardation protein* (FMRP), Nova-1 und 2, *deleted in azoospermia-associated protein 1* (DAZAP1) und hnRNP I, U, E1, K und E2. Außerdem geht die Bindung von hnRNP H3 verloren (siehe Abbildung 14).

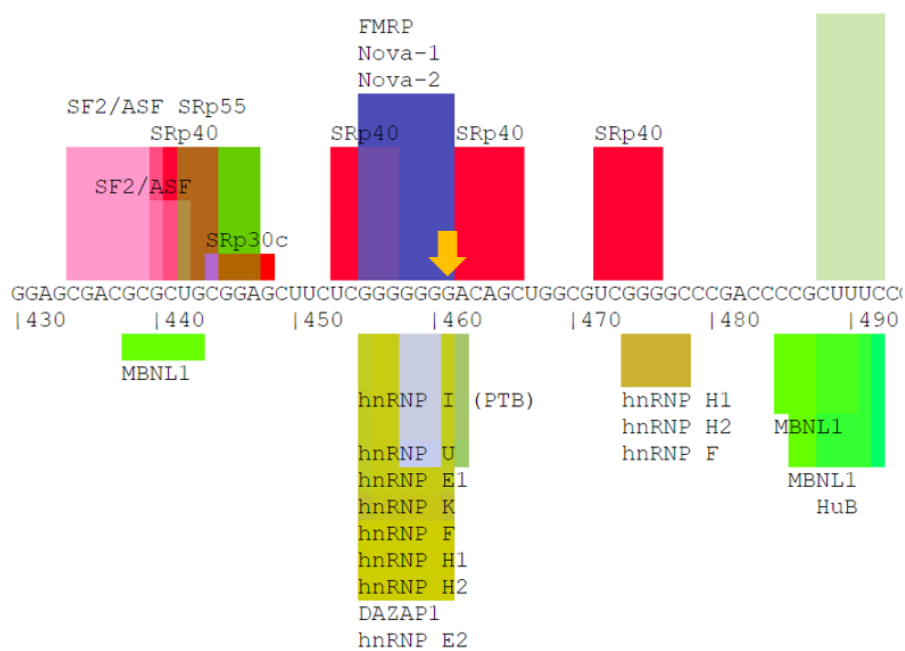
Das Ergebnis wurde in Abbildung 14 graphisch dargestellt. Hierbei wird Proteinen, die an ESE Motive binden, ein positiver Score (nach oben zeigender Balken) zugewiesen. Proteine, die an ESS binden, werden durch einen negativen Score (nach unten zeigenden Balken) repräsentiert (siehe Abbildung 14).



## Analyse der Wildtyp Sequenz



## Analyse der mutierten Sequenz



**Abbildung 14: *In silico* Analyse der Ursachen der Spleißmutation c.602dup mithilfe von SpliceAid**

*In silico* Analyse der Wildtyp Sequenz (oben) und der c.602dup mutierten Sequenz (unten) von Exon 5 bis 7 des *DUOX2* Gens mittels SpliceAid. Proteine, die an ESE Motive binden, werden als Balken nach oben dargestellt; Proteine, die an ESS Motive binden, als Balken nach unten. Im Bereich zwischen den Balken findet sich die Basensequenz, wobei die Mutation mit einem gelben Pfeil markiert ist. Darunter steht die Position der jeweiligen Base, gerechnet ab Beginn von Exon 5.

Bildquelle: erstellt mithilfe von <http://www.introni.it/splicing.html>

#### 4.6 *In silico* Analyse der Auswirkungen der Mutation c.602dup auf die Proteinsequenz

Die Auswirkungen der Mutation c.602dup auf die Proteinsequenz wurden mithilfe des Programms Translate von ExPASy Bioinformatics Resource Portal untersucht (siehe 3.4.3) (43). Die Wildtyp Sequenz wird in der untenstehenden Abbildung in Schwarz dargestellt (siehe Abbildung 15).

Bei der Analyse des mutierten *DUOX2* zeigte sich, dass die Duplikation der Base Guanin an Position 602 zu einem Frameshift führt. Codon 200 besteht aus drei aufeinanderfolgenden Basen Guanin, welches in die Aminosäure Glycin (G) übersetzt wird. Im Codon 201 kommt es nun zur Duplikation der Base Guanin, wodurch das Codon von GGA zu GGG wechselt. Dies führt aber zu keiner Veränderung auf Aminosäuren-Ebene, da beide genannten Codons für Glycin (G) codieren. Allerdings kommt es nun zu einem frameshift, sodass Codon 202 von CAG zu ACA wird und die Aminosäure an Position 202 von Glutamin zu Threonin wechselt (siehe blaue Markierung in Abbildung 15). Ab dieser Stelle ist die Aminosäuresequenz gegenüber der im Wildtyp verändert. Der frameshift führt außerdem zur Entstehung eines Stopcodons und zum Abbruch der Translation nach Position 299 (p.Gln202Thrfs\*99). Die entstehende Aminosäuresequenz wird in Rot dargestellt (siehe Abbildung 15).

Zum Schluss wurde getestet, welche Auswirkungen eine Spleiß-Mutation mit Fehlen des Exon 6 in der mRNA auf die Proteinsequenz hat. Exon 6 beginnt mit Codon 172, weshalb man ab der Aminosäure an Position 172 eine Veränderung der Sequenz sieht (siehe gelbe Markierung in Abbildung 15). Exon 5 endet zwar mit einem abgeschlossenen Codon, jedoch weist Exon 6 eine Basenzahl von 202 auf, die nicht durch 3 teilbar ist. Die letzte Base von Exon 6 würde also mit den ersten beiden Basen von Exon 7 ein Codon bilden. Bei Aus-Spleißen von Exon 6 kommt es somit zu einem frameshift und einer Veränderung der nachfolgenden Aminosäuresequenz. Dadurch entsteht ein neues Stopcodon, was einen Abbruch der Translation nach der Aminosäure an Position 252 bewirkt. Die entstehende Proteinsequenz wird in Abbildung 15 in Grün dargestellt.

1	11	21	31	41	51
MLRARPEALM	LLGALLTGSL	GPSGSQDALS	LPWEVQRYDG	WFNNLRHHER	GAVGCRLQRR
MLRARPEALM	LLGALLTGSL	GPSGSQDALS	LPWEVQRYDG	WFNNLRHHER	GAVGCRLQRR
MLRARPEALM	LLGALLTGSL	GPSGSQDALS	LPWEVQRYDG	WFNNLRHHER	GAVGCRLQRR
61	71	81	91	101	111
VPANYADGVY	QALEEPQLPN	PRRLSNAATR	GIAGLPSLHN	RTVLGVFFGY	HVLSDVVSVE
VPANYADGVY	QALEEPQLPN	PRRLSNAATR	GIAGLPSLHN	RTVLGVFFGY	HVLSDVVSVE
VPANYADGVY	QALEEPQLPN	PRRLSNAATR	GIAGLPSLHN	RTVLGVFFGY	HVLSDVVSVE
121	131	141	151	161	171
TPGCPAEFLN	IRIPPGDPVF	DPDQRGDVVL	PFQSRWDPE	TGRSPSNPRD	LANQVTGWLD
TPGCPAEFLN	IRIPPGDPVF	DPDQRGDVVL	PFQSRWDPE	TGRSPSNPRD	LANQVTGWLD
TPGCPAEFLN	IRIPPGDPVF	DPDQRGDVVL	PFQSRWDPE	TGRSPSNPRD	LPSQREGTG
181	191	201	211	221	231
GSAIYGSSHS	WSDALRSFSG	GQLASGPDPA	FPRDSQNPLL	MWAAPDPATG	QNGPRGLYAF
GSAIYGSSHS	WSDALRSFSG	GTAGVGARPR	FPPRLAEPPE	HVGGARPRHR	AERAPGAVRL
NPCRRWACS	GSATTCGRR	GWPASTQTGR	TRSCSSTHAR	GSSPPTRTSL	CMSGCPASCR
241	251	261	271	281	291
GAERGNREPF	LQALGLLWFR	YHNLWAQRLA	RQHPDWEDEE	LFQHARKRVI	ATYQNIAYVE
RGREREPTL	PAGAGPALVP	LPQPVGAEG	PPAPRLGGRG	AVPARTQEGH	RHLPEHRCV
KHSRSIQDTV	LS				
301	311	321	331	341	351
WLPSFLQKTL	PEYTYRPFPL	DPSISPEFVV	ASEQFFSTMV	PPGVYMRNAS	CHFRKVLNKG
361	371	381	391	401	411
FQSSQALRVC	NNYWIRENPN	LNSTQEVNEL	LLGMASQISE	LEDNIVVEDL	RDYWPGGPKF
421	431	441	451	461	471
SRTDYVASSI	QRGRDMGLPS	YSQALLAFGL	DIPRNWSDLN	PNVDPQVLEA	TAAALYNQDLS
481	491	501	511	521	531
QLELLLGGLL	ESHGDPGPLF	SAIVLDQFVR	LRDGDYWFEE	NTRNGLFSKK	EIEDIRNTTL
541	551	561	571	581	591
RDVLVAVINI	DPSALQPNVF	VWHKGAPCPQ	PKQLTTDGLP	QCAPLTVLDF	FEGSSPGFAI
601	611	621	631	641	651
TIIALCCLPL	VSLLLSGVVA	YFRGREHKKL	QKKLKESVKK	EAAKDGVPAM	EWPGPKERSS
661	671	681	691	701	711
PIIIQLLSDR	CLQVLNRHLT	VLRVVQLQPL	QQVNLILSNN	RGCRTLLLKI	PKEYDLVLLF
721	731	741	751	761	771
SSEEERGAFF	QQLWDFCVRW	ALGLHVAEMS	EKELFRKAVT	KQQRERILEI	FFRHLFAQVL
781	791	801	811	821	831
DINQADAGTL	PLDSSQKVRE	ALTCELSRAE	FAESLGLKPQ	DMFVESMFSL	ADKDGNGYLS
841	851	861	871	881	891
FREFLDILVV	FMKGSPEDKS	RLMFTMYDLD	ENGFLSKDEF	FTMMRSFIEI	SNNCLSKAQL
901	911	921	931	941	951
AEVVESMFRE	SGFQDKEELT	WEDFHMLRD	HDSELRFTQL	CVKGGGGGGN	GIRDIFKQNI
961	971	981	991	1001	1011
SCRVSFITRT	PGERSHPQGL	GPPAPEAPEL	GGPGLKKRFG	KKAAVPTPRL	YTEALQEKMQ
1021	1031	1041	1051	1061	1071
RGFLAQKLQO	YKRFVENYRR	HIVCVAIFSA	ICVGVFADRA	YYYGFASPPS	DIAQTTLVGI
1081	1091	1101	1111	1121	1131
ILSRGTAASV	SFMFSYILLT	MCRNLITFLR	ETFLNRYVPF	DAAVDFHRWI	AMAAVVLAIL
1141	1151	1161	1171	1181	1191
HSAGHAVNVY	IFSVSPLSLL	ACIFPNVFN	DGSKLPQKFY	WFFFQTVPGM	TGVLLLLVLA
1201	1211	1221	1231	1241	1251
IMYVFASHHF	RRRSFRGFWL	THHLYILLYA	LLIIHGSYAL	IQLPTFHIYF	LVPAIYGGD
1261	1271	1281	1291	1301	1311
KLVSLSRKKV	EISVVKAEEL	PSGVTYLQFQ	RPQGFYKSG	QWVRIACLAL	GTTEYHPFTL
1321	1331	1341	1351	1361	1371
TSAPHEDTLS	LHIRAVGPWT	TRLREIYSSP	KGNGCAGYPK	LYLDGPFGEF	HQEWKFEVS
1381	1391	1401	1411	1421	1431
VLVGGGIGVT	PFASILKDLV	FKSSLGSQML	CKKIYFIWVT	RTQRQFEWLA	DIIQVEEND
1441	1451	1461	1471	1481	1491
HQDLVSVHIY	VTQLAEKFDL	RTTMLYICER	HFQKVLNRSI	FTGLRSITHF	GRPPFEPFFN
1501	1511	1521	1531	1541	
SLQEVHPQVR	KIGVFSCGPP	GMTKNVEKAC	QLVNRQDRAH	FMHHYENF	

### Abbildung 15: Aminosäuresequenz des DUOX2 Wildtyps, der Frameshift-Variante sowie der Spleiß-Variante der Mutation c.602dup

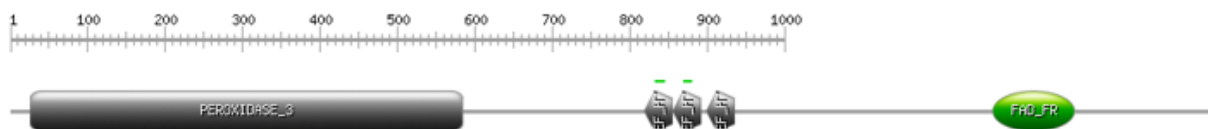
Die Abbildung zeigt die Aminosäuresequenz des DUOX2 Wildtyp Proteins in Schwarz. Die rote Sequenz stellt die Variante des DUOX2 Proteins dar, welche durch die Duplikation der Base Guanin an Position 602 und des daraus folgenden theoretischen Frameshifts entsteht (p.Gln202Thrfs\*99). Durch die blaue Markierung wird der Beginn des Frameshifts markiert. In Grün wird die DUOX2 Variante dargestellt, die aus einem Fehlen von Exon 6 in der mRNA resultiert. Dies könnte durch eine Störung des Spleiß-Mechanismus aufgrund der Mutation geschehen. Die gelbe Markierung zeigt die erste veränderte Aminosäure und stellt den Beginn von Exon 7 dar. Die Ziffern zeigen jeweils die Position der Aminosäure im Protein. Die Buchstaben repräsentieren die Aminosäuren nach dem Einbuchstaben-Code. A: Alanin, R: Arginin, N: Asparagin, D: Asparaginsäure, C: Cystein, Q: Glutamin, E: Glutaminsäure, G: Glycin, H: Histidin, I: Isoleucin, L: Leucin, K: Lysin, M: Methionin, F: Phenylalanin, P: Prolin, S: Serin, T: Threonin, W: Tryptophan, Y: Tyrosin, V: Valin

*Bildquelle: erstellt nach Informationen von Translate von ExPASy Bioinformatics Resource Portal*

### 4.7 In silico Analyse der Auswirkungen der Mutation c.602dup auf die DUOX2 Proteinstruktur

Zur *in silico* Untersuchung der Auswirkungen der Mutation c.602dup auf die Proteinstruktur wurde das Programm prosite verwendet (siehe 3.4.4).

Bei der Analyse des Wildtyp DUOX2 Proteins wurde eine Peroxidase-3 ähnliche Domäne, 3 EF-Hand-Motive sowie eine FAD-Bindedomäne vorhergesagt (siehe Abbildung 16). Dies stimmt gut mit der in der Literatur beschriebenen Proteinstruktur überein (siehe 2.4). Hier werden ebenfalls eine Peroxidase-ähnliche Domäne und eine FAD-Bindestelle beschrieben, allerdings nur 2 EF-Hand-Motive und eine zusätzliche NADPH-Bindestelle (8) (15).



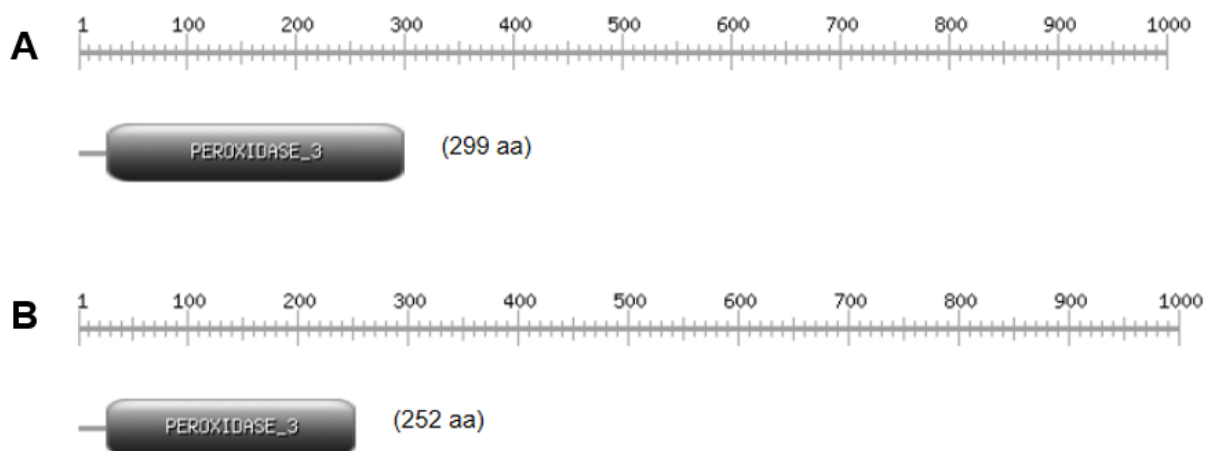
### Abbildung 16: Schematische Darstellung der vorhergesagten Proteinstruktur des DUOX2 Wildtyp Proteins

Laut Vorhersage des Programms prosite von ExPASy enthält das DUOX2 Wildtyp Protein eine Peroxidase-3 ähnliche Domäne, 3 EF-Hand Motive und eine FAD-Bindestelle. Die Skala gibt die Position der Aminosäuren wieder. Abkürzungen: EF-H: EF-Handmotiv, FAD\_FR: FAD-Bindestelle

*Bildquelle: erstellt mithilfe von <https://prosite.expasy.org/>*

Anschließend wurde die Aminosäuresequenz analysiert, die theoretisch durch den frühzeitigen Translationsstopp aufgrund des neu gebildeten Stopcodons entstehen könnte (p.Gln202Thrfs\*99). Hier zeigt sich, dass nur Teile der Peroxidase-3 ähnlichen Domäne erhalten bleiben. Die Transmembrandomänen, die EF-Hand Motive sowie die FAD- und NADPH-Bindestellen scheinen demnach wegzufallen (siehe Abbildung 17A). Die wichtige Disulfidbrücke zwischen den Cystein-Resten 124 und 1162 (siehe 5.7) kann sich auch nicht ausbilden, da die Proteinsequenz ab der Aminosäuren-Position 202 verändert und ab Position 299 abgebrochen ist (siehe 4.6).

Durch die Mutation c.602dup in *DUOX2* fehlt Exon 6 in der mRNA aufgrund einer Störung des Spleißens (2) (siehe 4.3). Dies führt zu einer veränderten und auf 252 Aminosäuren verkürzten Sequenz (siehe 4.6). Auch hier sind nur noch Teile der Peroxidase-3 ähnlichen Domäne im Protein enthalten. Es fehlen also ebenso die Transmembrandomänen, die EF-Hand Motive, die FAD- und NADPH-Bindestellen sowie die intramolekulare Disulfidbrücke (siehe Abbildung 17B).



**Abbildung 17: Schematische Darstellung der vorhergesagten Proteinstruktur des mutierten DUOX2 Proteins**

Mithilfe des Programms prosite von ExPASy wurde die Proteinstruktur des mutierten DUOX2 Proteins vorhergesagt und schematisch dargestellt. Die obere Abbildung (A) zeigt hierbei das Ergebnis der Analyse der Aminosäuresequenz, die durch einen frühzeitigen Translationsstopp aufgrund des neu gebildeten Stopcodons entstehen könnte (p.Gln202Thrfs\*99). Das Protein besteht aus 299 Aminosäuren und enthält noch Anteile einer Peroxidase-3 ähnlichen Domäne. Die untere Abbildung (B) zeigt die Proteinstruktur der durch Spleißmutation entstandenen Aminosäuresequenz. Das Protein besteht aus 252 Aminosäuren und enthält ebenfalls noch Anteile einer Peroxidase-3 ähnlichen Domäne.

Bildquelle: erstellt mithilfe von <https://prosite.expasy.org/>

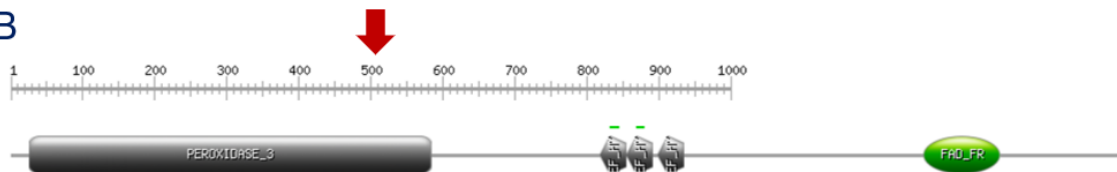
#### 4.8 *In silico* Analyse der Auswirkungen der Mutation c.1516G>A auf die Proteinsequenz

Durch die Mutation c.1516G>A, welche bei der Patientin B heterozygot vorliegt, kommt es an Position 506 zu einem Wechsel des Codons von GAC zu AAC. Daraus resultiert eine Substitution der Aminosäure Asparaginsäure zu Asparagin (p.D506N) (siehe Abbildung 18A). Die Aminosäure an Position 506 des DUOX2 Proteins liegt innerhalb der Peroxidase-3 ähnlichen Domäne (siehe Abbildung 18B).

**A**

301	311	321	331	341	351
WLPSFLQKTL	PEYTGYPFL	DPSISPEFVV	ASEQFFSTMV	PPGVYMRNAS	CHFRKVLNKG
361	371	381	391	401	411
FQSSQALRVC	NNYWIREPN	LNSTQEVNEL	LLGMASQISE	LEDNIVVEDL	RDYWP GPGKF
421	431	441	451	461	471
SRTDYVASSI	QRGRDMGLPS	YSQALLAFGL	DIPRNWSDLN	PNVDPQVLEA	TAALYNQDLS
481	491	501	511	521	531
QLELLLGGLL	ESHGDPGPLF	SAIVLDQFVR	LRDGDYWF	NTRNGLFSKK	EIEDIRNTTL
541	551	561	571	581	591
RDVLVAVINI	DPSALQPNVF	VWHKGAPCPQ	PKQLTTDGLP	QCAPLTVLDF	FEGSSPGFAI
601	611	621	631	641	651
TIIALCCLPL	VSLLLSGVVA	YFRGREHKKL	QKKLKESVKK	EAAKDGVPAM	EWPGPKERS

**B**



**Abbildung 18:A) Auswirkungen der Mutation c.1516G>A auf die Proteinsequenz, B) Lokalisation der Mutation c.1516G>A im DUOX2 Protein**

**A** An Position 506 des c.1516G>A mutierten DUOX2 Proteins wechselt die Aminosäure Asparaginsäure (D) zu Asparagin (N) (siehe rote Umrandung). In dieser Abbildung ist nur der Abschnitt der Proteinsequenz von Position 301 bis 660 des DUOX2 Proteins gezeigt. Die vollständige Aminosäuresequenz des Wildtyp Proteins von DUOX2 findet sich in Abbildung 15 in Schwarz. Die Buchstaben repräsentieren die Aminosäuren nach dem Einbuchstaben-Code. A: Alanin, R: Arginin, N: Asparagin, D: Asparaginsäure, C: Cystein, Q: Glutamin, E: Glutaminsäure, G: Glycin, H: Histidin, I: Isoleucin, L: Leucin, K: Lysin, M: Methionin, F: Phenylalanin, P: Prolin, S: Serin, T: Threonin, W: Tryptophan, Y: Tyrosin, V: Valin

**B** Die Position der Mutation im DUOX2 Protein ist durch den roten Pfeil markiert und liegt innerhalb der Peroxidase-3 ähnlichen Domäne.

*Bildquelle: A: erstellt mithilfe von Translate des ExpASy Bioinformatics Resource Portal, B: erstellt mithilfe von <https://prosite.expasy.org/>*

## 5. Diskussion

### 5.1 Analyse der durch die Spleißmutation c.602dup veränderten ESEs/ESSs

Das Programm SpliceAid zeigte, dass es durch die Mutation c.602 dup im *DUOX2* Gen zu einer zusätzlichen Bindung von FMRP, hnRNP I, U, E1, K und E2, Nova-1 und 2 und DAZAP1 kommt. Die Bindung von hnRNP H3 dagegen geht verloren (siehe Abbildung 14).

Das fragile X mental retardation protein (FMRP) wird durch das *FMR1* Gen codiert (45). Bei Betroffenen mit Fragilen-X-Syndrom kommt es zu einer Trinukleotid-Expansion (CGG) im *FMR1* Gen auf dem X-Chromosom, was zu einer Methylierung des Promotors und damit zu einer fehlenden Expression von FMRP führt (45). Siomi et al. zeigten bereits 1993, dass FMRP RNA-Bindekapazität aufweist. Welche Funktion das Protein beim Spleißen allerdings genau erfüllt, bleibt unklar. Zwei der RNA-Bindedomänen von FMRP weisen aber homologe Domänen zu hnRNP K auf (46).

Yamamoto et al. zeigten anhand des Hitzeschockproteins 105, dass hnRNP K bei Bindung an die mRNA zu einer Exklusion von Exon 12 führt (47). Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit von FMRP und hnRNP K wäre es also möglich, dass es durch die Bindung von FMRP an die *DUOX2* prä-mRNA zum Fehlen von Exon 6 in der reifen mRNA kommt.

Ule et al. zeigten, dass Nova-1 und 2 durch Bindung an die prä-mRNA sowohl zur Integration des Exons in die reife mRNA als auch zum Überspringen des Exons führen kann. Dies ist abhängig davon, wo die Bindungsstelle für Nova liegt. Bindet Nova an ein Intron, führt dies zum Einfügen des Exons in die reife mRNA. Eine Bindung von Nova an ein Exon führt allerdings dazu, dass sich das U1-snRNP nicht an die prä-mRNA anlagern kann und das entsprechende Exon nicht in die reife mRNA integriert wird. (48)

Da die Bindestelle von Nova-1 und 2 hier im Bereich des Exons 6 liegt, könnte dies ebenfalls zum Überspringen und damit zum Fehlen von Exon 6 in der reifen mRNA des *DUOX2* Gens führen.

hnRNPs binden an ESSs und verhindern damit die Integration des entsprechenden Exons in die reife mRNA (siehe 2.9) (33). Durch die hier vorliegende Mutation kommt es zu einer Veränderung der Bindung der verschiedenen hnRNPs. Zusätzlich zur Wildtyp Sequenz interagieren nun hnRNP I, U, E1, K und E2 mit der mutierten Sequenz. Dies könnte ebenfalls zum Fehlen von Exon 6 beitragen.

Auch DAZAP1 (deleted in azoospermia-associated protein 1) führt durch die Bindung an die prä-mRNA zu einem Überspringen des Exons (49). Goina et al. demonstrierten dies anhand einer stillen Mutation im Exon 18 des *BRCA1* Gens. Sie untersuchten die Faktoren, die zu einer verminderten Integration des Exon 18 in die reife mRNA des *BRCA1* Gens führen. Sie zeigten, dass durch die Mutation ein ESS entsteht, an das unter anderem DAZAP1 bindet. Dadurch wird Exon 18 beim Spleißen übersprungen und ist damit nicht mehr in der reifen mRNA enthalten. (49)

Auch durch die Duplikation der Base Guanin in Exon 6 des *DUOX2* Gens scheint eine neue Bindestelle für DAZAP1 zu entstehen. Es wäre also denkbar, dass die Bindung von DAZAP1 an ein neu entstandenes ESS zum Überspringen von Exon 6 während des Spleißvorgangs von *DUOX2* führt.

Damit sind mehrere Faktoren identifiziert, die eine mögliche Erklärung für das Fehlen von Exon 6 in der reifen mRNA liefern. Ob jeder einzelne dieser Faktoren oder alle in Kombination miteinander auch tatsächlich das Spleißen im hier vorliegenden Fall verändern, müsste experimentell überprüft werden. Hierfür könnten z.B. *small interfering RNA* (siRNA) verwendet werden. Sie stellen kleine RNA-Moleküle dar, die durch komplementäre Bindung an die mRNA zum einen zu einer Unterdrückung der Translation führen. Zum anderen wird die von siRNA gebundene mRNA abgebaut und somit wird das entsprechende Protein nicht synthetisiert. (50)

Um den Einfluss der oben genannten Proteine (FMRP, Nova-1 und -2, DAZAP1 und hnRNPs) auf das Spleißen von *DUOX2* zu analysieren, müssten siRNA Moleküle entworfen werden, die komplementär zur mRNA der Proteine sind. Diese müssten als doppelsträngige RNA Moleküle zusammen mit dem mutierten Genabschnitt von *DUOX2* durch transiente Transfektion in die Zellen eingebracht werden. Dicer, eine RNaseIII, spaltet aus den doppelsträngigen RNA Molekülen 21-25 Nukleotid lange siRNA Moleküle. Die Bindung dieser siRNA an die entsprechende mRNA führt dann zur verminderten Synthese der oben genannten Faktoren. Dadurch könnte die Proteinexpression der Faktoren einzeln oder in Kombination miteinander drastisch



reduziert werden. So könnte der funktionale Effekt auf die Integration von Exon 6 in die reife mRNA analysiert werden. Hat ein Faktor beispielsweise einen hohen Einfluss auf das Spleißen, würde nach dessen Ausschalten vermehrt reife mRNA mit erhaltenem Exon 6 isoliert werden können.

## 5.2 Diskussion des klinischen Verlaufs der Patientin A

Durch den Nachweis der Mutation c.602dup im *DUOX2* Gen wurde die molekulargenetische Ursache der bei der Patientin vorliegenden kongenitalen Hypothyreose identifiziert. Durch sie wird ein wichtiger Schritt in der Produktion der Schilddrüsenhormone gestört: Es kann nicht genügend Wasserstoffperoxid für die Oxidation des Iodids zur Verfügung gestellt werden, wodurch es zu einer Unterversorgung des Körpers mit Schilddrüsenhormonen kommt (siehe 2.3). Dies wurde bei der Patientin durch das auffällige Neugeborenencreening anhand des erhöhten TSH und der erniedrigten fT3/4 Werte diagnostiziert, obwohl die Schilddrüse normal angelegt war. Die Sonographie zeigte eine orthotop gelegene Schilddrüse mit einem altersentsprechenden Volumen von 0,9 ml. Die Mutation c.602dup im *DUOX2* Gen bestätigt somit die Diagnose einer Störung der Schilddrüsenhormonsynthese (siehe 2.7).

Bei Betrachtung des Bedarfs an L-Thyroxin fällt auf, dass dieser in der Phase nach der Geburt besonders hoch war (50 µg/d). Bereits nach 1,5 Monaten wurde die Dosis auf 37,5 µg/d und nach 10 Monaten erneut auf 25 µg/d reduziert (siehe Tabelle 1). Nach der Geburt ist der Bedarf an Schilddrüsenhormonen besonders hoch (12-15 µg/kg/d) (15). Bereits innerhalb der ersten 6 Monate sinkt der Bedarf auf 6 µg/kg/d, um nach dem ersten Jahr ein Plateau von ca. 3 µg/kg/d zu erreichen (15). Im Erwachsenenalter liegt der Bedarf bei 1-2 µg/kg/d (51). Durch die heterozygote Mutation im *DUOX2* Gen besteht bei der Patientin eine Haploinsuffizienz, das heißt, dass die Kapazität, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu produzieren, theoretisch auf 50% reduziert wird, wenn von einer gleichmäßigen biallelischen Expression des *DUOX2* Gens ausgegangen wird. Es wäre also denkbar, dass diese Kapazität in den ersten Lebensmonaten aufgrund des erhöhten Bedarfs nicht ausreicht. Im Verlauf nimmt der Schweregrad der Hypothyreose allerdings oft ab, da auch der Bedarf an Schilddrüsenhormonen geringer wird (15).

Im weiteren Verlauf fällt auf, dass die Dosis an L-Thyroxin im Patientenalter von 13 Jahren erneut auf 37,5 µg/d erhöht werden musste. Dies könnte mit dem Eintritt der Patientin in die Pubertät und dem damit einhergehenden erhöhten Bedarf an Schilddrüsenhormonen erklärt werden (15).

Moreno et al. weisen darauf hin, dass es im Fall einer späteren Schwangerschaft von Patienten mit *DUOX2* Mutationen besonders wichtig ist, die Schilddrüsenhormonwerte engmaschig zu kontrollieren. Zum einen ist der Bedarf an Schilddrüsenhormonen hier besonders hoch, zum anderen könnte der Fetus eventuell ebenfalls den Defekt im *DUOX2* Gen geerbt haben und damit vor allem im 2. und 3. Trimenon zu wenig Schilddrüsenhormon produzieren. Für die psychomotorische Entwicklung des Fötus ist aber eine ausreichende Versorgung mit Schilddrüsenhormonen essenziell und sollte deswegen unbedingt gewährleistet werden. (15)

### **5.3 Monoallelische Expression als Erklärungsversuch für den verschiedenen Phänotyp bei Patientin A und ihrer Mutter**

Die Sequenzierung des Exons 6 des *DUOX2* Gens beider Elternteile der Patientin zeigte, dass die Patientin die Mutation von ihrer Mutter geerbt hat. Sowohl sie als auch die Patientin sind heterozygot für die Mutation c.602dup des *DUOX2* Gens. Obwohl beide den gleichen Genotyp im *DUOX2* Gen haben, zeigen sie einen unterschiedlichen Phänotyp: Die Patientin leidet seit ihrer Geburt an einer Hypothyreose, während ihre Mutter normwertige Schilddrüsenwerte und auch in der Anamnese keine klinischen Hinweise für eine Schilddrüsenunterfunktion aufweist. Diese Diskrepanz könnte durch eine monoallelische Expression erklärt werden. Es wäre möglich, dass bei der Patientin überwiegend das Allel mit der Mutation und bei der Mutter stattdessen vor allem das gesunde Allel transkribiert wird.

Klassischerweise wird davon ausgegangen, dass in diploiden eukaryotischen Zellen beide homologen Allele eines Gens ähnlich stark exprimiert werden. Es gibt allerdings auch einige Gene, die monoallelisch exprimiert werden. Laut Gimelbrant et al. können diese in drei Gruppen eingeteilt werden (52).

Die erste Gruppe besteht laut Gimelbrant et al. aus autosomalen Genen, bei denen entweder nur das maternale oder nur das paternale Allel exprimiert wird (52). Laut Bartolomei et al. werden in den Keimzellen der Eltern bestimmte Gene durch epigenetische Markierungen, wie DNA-Methylierung oder Histon-Modifikation, stillgelegt. Dieser Vorgang wird als genomisches Imprinting bezeichnet. Dies betrifft bei der Gametogenese des Mannes andere Gene als bei der der Frau. Folglich gibt es bei einem Kind einige Gene, die nur durch ein Allel exprimiert werden, entweder durch das maternale oder durch das paternale. Beim Ausfall eines Allels, zum Beispiel durch eine Mikrodeletion, kann das stillgelegte Allel diesen Verlust nicht kompensieren. (53)

Beim Prader-Willi-Syndrom zum Beispiel führt eine Deletion im Chromosom 15 im paternalen Allel zu einem Funktionsverlust einiger Gene, die in diesem Bereich liegen, da diese Gene im maternalen Allel stillgelegt sind. Die Kinder zeigen eine Muskelhypotonie, eine Hyperphagie, die später zu Adipositas führen kann, und einen Hypogonadismus. (53) Betrifft die Deletion die gleiche Region des Chromosoms 15, allerdings im maternalen Allel, kommt es zum Ausfall des Ubiquitin–protein ligase E3A (*UBE3A*) Gens, da dieses im paternalen Allel stillgelegt ist (54). Dies resultiert im Angelman-Syndrom, welches durch Mikrozephalie, Krampfanfälle, Ataxie, Muskelhypotonie und geistige sowie motorische Entwicklungsverzögerungen charakterisiert ist (54). Eine Deletion im selben Abschnitt des Chromosoms 15 führt also aufgrund des Imprintings zu zwei völlig verschiedenen Syndromen, je nachdem welches Allel betroffen ist.

Die zweite Gruppe laut Gimelbrant et al. beschreibt die Inaktivierung eines X-Chromosoms bei weiblichen Individuen zum Zeitpunkt der Einnistung des Embryos. Diese Inaktivierung erfolgt zufällig, sodass ungefähr die Hälfte der Zellen das maternale und die andere Hälfte das paternale X-Chromosom exprimieren. (52)

Sun et al. besprechen die damit in Zusammenhang stehende X-chromosomal dominant vererbte Erkrankung Incontinentia pigmenti (55). Sie wird durch eine Mutation im NF-KappaB essential modulator Gen (*NEMO*) hervorgerufen und ist bei männlichen Individuen letal. Bei heterozygoten weiblichen Neugeborenen zeigen sich Bläschen auf der Haut, welche sich im Verlauf der Kindheit zu einer Hyperpigmentierung wandeln. Mit Beginn des Erwachsenenalters verschwindet diese wieder und kann sich später zu einer Hypopigmentierung mit atrophischen Läsionen

entwickeln. Diese Hauterscheinungen folgen den Blaschko-Linien. Diese entstehen durch die Wanderung der Hautzellen während der Embryonalzeit. Areale mit Zellen, bei denen das gesunde X-Chromosom inaktiviert ist, zeigen die Hauterscheinungen, während Bereiche der Haut mit Zellen mit inaktiviertem mutiertem X-Chromosom nicht betroffen sind. (55)

Zur dritten Gruppe laut Gimelbrant et al. gehören autosomale Gene, bei denen die Auswahl des exprimierten Allels zufällig erfolgt. Manche Zellen exprimieren also das maternale, andere nur das paternale Allel, andere Zellen exprimieren weiterhin beide Allele. Insgesamt scheinen mehr als 5% aller menschlichen Gene einer zufälligen monoallelischen Expression zu unterliegen. Beispiele hierfür sind Gene für Geruchsrezeptoren, Immunglobuline, T-Zell-Rezeptoren und Interleukine. (52)

Der Sinn dieser zufälligen Inaktivierung eines Allels in autosomalen Genen (RME = random monoallelic expression) ist bislang weitgehend unklar. Gui et al. vermuten, dass dadurch eine große Variabilität im Transkriptionsmuster einer Zelle entsteht, woraus eine Vielfalt an verschiedenen Zellen resultiert. Im Riechepithel beispielsweise existieren unter anderem aufgrund der monoallelischen Expression viele verschiedene Geruchsrezeptoren. RME könnte auch eine Erklärung für den variablen Phänotyp bei autosomal-dominant vererbten Erkrankungen liefern. Von der zufälligen Inaktivierung kann sowohl das mutierte als auch das Wildtyp Allel betroffen sein. Bei überwiegender Expression des mutierten Allels und Inaktivierung des Wildtyp Allels könnte der Phänotyp viel stärker ausgeprägt sein als bei einer verstärkten Expression des Wildtyp Allels. (56)

Fugazzola et al. beschreiben eine Familie mit drei Fällen von kongenitaler Hypothyreose aufgrund einer heterozygoten missense Mutation im *TPO* Gen (c.2167 C>T, p.R693W). Der Vater ist heterozygoter Träger der Mutation. Drei seiner Kinder haben diese Mutation von ihm geerbt. Allerdings sind nur die drei Kinder von einer Hypothyreose betroffen, während der Vater euthyreot ist. Da bei einem der Kinder eine Thyreoidektomie erfolgte, wurde die RNA im Schilddrüsengewebe durch reverse Transkription analysiert. Hier zeigte sich, dass bei diesem Patienten nur das Allel, welches die Mutation trägt, exprimiert wird. Möglicherweise kann diese Beobachtung durch eine zufällige Inaktivierung des Wildtyp *TPO*-Allels durch RME erklärt werden. (57)

## 5.4 Diskussion des klinischen Verlaufs der Patientin B

Die Patientin B zeigte bei Geburt eine ausgeprägte Hypothyreose, wofür als Ursache ein compound-heterozygoter Mutationsstatus im *DUOX2* Gen gefunden wurde (c.602dup, c.1516G>A). Die bei ihr festgestellte Hypothyreose fällt somit ebenso in die Kategorie der Schilddrüsenhormonbiosynthesestörungen (siehe 2.7). Entsprechend hierzu wurde bei ihr sonographisch eine normal angelegte, etwas vergrößerte Schilddrüse gefunden.

Im Gegensatz zur Patientin A bestand bei Patientin B allerdings eine transiente Hypothyreose. Nach Vollendung des 2. Lebensjahres konnte die Dosis an L-Thyroxin schrittweise reduziert und letztendlich abgesetzt werden.

Grasberger et al. untersuchten die bei der Patientin B vorliegende Mutation c.1516G>A bzw. p.D506N *in vitro*, indem die HeLa Zellen mit *DUOX2* cDNA des Wildtyp Proteins und der p.D506N Variante transfizierten und die Menge an produziertem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maßen. Hierbei zeigte sich, dass die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Bildungsrate bei der p.D506N Mutation um 50% gegenüber dem Wildtyp reduziert war. Außerdem untersuchten sie den Transport des p.D506N mutierten *DUOX2* Proteins an die Zelloberfläche. Im Vergleich zum Wildtyp Protein war die Expression dort auf 35% reduziert. Insgesamt scheint also der gestörte Transport zur Zelloberfläche für die reduzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Bildungskapazität verantwortlich zu sein, während die intrinsische Aktivität des p.D506N *DUOX2* Protein nicht reduziert ist. Auch die Bildung der Disulfidbrücken und die räumliche Struktur des p.D506N *DUOX2* Proteins zeigt sich unverändert. (58)

Das c.1516G>A mutierte *DUOX2* Protein scheint also eine Restfunktion von ungefähr 50 % zu besitzen (58). Das c.602dup Protein ist durch das veränderte Spleißen dagegen wahrscheinlich weitgehend funktionslos, da wichtige Teile des Proteins durch das vorzeitige Stopcodon fehlen (siehe 4.7) und das mutierte Protein wahrscheinlich nicht an die Zellmembran transportiert wird (siehe 5.10), weswegen das c.1516G>A *DUOX2* Protein vermutlich allein für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Generierung aufkommt.

Mithilfe des Erklärungsmodells der monoallelischen Expression und der Haploinsuffizienz lässt sich der Phänotyp der Patientin B erklären. Durch die Inaktivierung des c.602dup *DUOX2* Allels könnte bei der Patientin B vor allem das p.D506N *DUOX2* Protein synthetisiert werden. Da dieses in seiner H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildungskapazität auf ungefähr 50% reduziert ist, reicht diese möglicherweise in den ersten Lebensmonaten nicht aus, um eine euthyreote Stoffwechsellage zu erreichen. Hier ist der Bedarf an Schilddrüsenhormonen mit 12-15 µg/kg/d sehr hoch (siehe 5.2) (15). Aufgrund des nach einem Jahr reduzierten Bedarfs auf 3 µg/kg/d (15) wäre es denkbar, dass das p.D506N *DUOX2* Protein dann genügend H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bilden kann, um eine ausreichende Versorgung des Körpers mit Schilddrüsenhormonen zu erreichen.

Mit Eintritt in die Pubertät könnte der Bedarf an Schilddrüsenhormonen jedoch wieder steigen, sodass hier eine engmaschige Verlaufskontrolle der Schilddrüsenparameter notwendig ist. Auch bei der Mutter der Patientin, welche im Alter von 15 Jahren ein Jahr ein Kombinationspräparat aus L-Thyroxin und Kaliumiodid einnahm, könnte eine passagere Hypothyreose in der Pubertät vorgelegen haben. Sie besitzt zwar, im Gegensatz zu ihrer Tochter, ein Wildtyp *DUOX2* Allel, durch überwiegende monoallelische Expression des c.1516G>A *DUOX2* Allels wäre eine hypothyreote Stoffwechsellage in Lebenssituationen mit einem erhöhten Bedarf an Schilddrüsenhormonen aber trotzdem denkbar.

Auch der Bruder der Patientin B ist heterozygoter Träger der c.1516G>A Mutation. Bisher waren keine Symptome einer Hypothyreose aufgetreten und die körperliche und geistige Entwicklung war normal. Eventuell könnte aber auch bei ihm eine passagere Hypothyreose auftreten.

## 5.5 *Nonsense-mediated mRNA decay* als Erklärungsversuch für den Phänotyp der Patientin B

Unter *nonsense-mediated mRNA decay* versteht man einen Kontrollmechanismus eukaryotischer Zellen, mRNA mit einem vorzeitigen Stopcodon zu erkennen und abzubauen (59). Dadurch soll die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen und dadurch entstehende dominant-negative Effekte verhindert werden (59).

Pohlenz et al. beschreiben eine Patientin, die compound heterozygot für das Natrium-Iodid-Symporter (*NIS*) Gen ist. Das maternale Allel enthält die Mutation nt.1940C>G im *NIS* Gen. Diese führt zum einen zur Entstehung eines Stopcodons und zum anderen zur Aktivierung einer kryptischen 3'-Spleißstelle. Dadurch gehen 67 Basen der mRNA verloren und es entsteht ein frameshift mit einem frühzeitigen Stopcodon. Das paternale Allel enthält die Mutation nt.1146C>G, welche zu einer Substitution der Aminosäure Glutamin zu Glutaminsäure führt (p.Q267E). Dieser mutationstragende *NIS* zeigte *in vitro* keine Restfunktion in der Jodidaufnahme. Aufgrund einer Thyreoidektomie konnte die vorliegende RNA analysiert werden. Alle 28 isolierten RNA Moleküle enthielten die nt.1146C>G Mutation. Das maternale Allel scheint also kaum oder gar nicht exprimiert zu werden. Dies könnte an der Eigenschaft eukaryotischer Zellen, vorzeitige Stopcodons zu erkennen und entsprechende mRNA Moleküle abzubauen, liegen. (60)

Die bei den Patientinnen vorliegende Mutation c.602dup im *DUOX2* Gen führt durch ein verändertes Spleißen zu einem vorzeitigen Stopcodon. Durch *nonsense-mediated mRNA decay* könnte die mRNA des c.602dup *DUOX2* Gens bei der Patientin B abgebaut und somit vor allem das p.D506N *DUOX2* Protein synthetisiert werden, welches vermutlich eine Restaktivität von ungefähr 50% aufweist (siehe 5.4) (58). Zusätzlich zur monoallelischen Expression könnte also auch *nonsense-mediated mRNA decay* dazu führen, dass bei Patientin B vor allem das p.D506N *DUOX2* Protein produziert wird. Dieses weist wahrscheinlich eine Restfunktion von ca. 50% auf und könnte somit die transiente Hypothyreose der Patientin B erklären (siehe 5.4) (58).

## 5.6 Vergleich des klinischen Verlaufs der Patientinnen A und B mit den in der Literatur beschriebenen Patienten/-innen

### 5.6.1. Auswirkungen der Mutationen auf den Schweregrad der Hypothyreose

Moreno et al. beschreiben 4 Patienten mit *DUOX2* Mutationen, die alle zu einem vorzeitigen Stopcodon und damit zu einem verkürzten Protein und wahrscheinlichem Verlust der NADPH- und FAD-Bindestelle führen (siehe 2.4). Patient 1 weist eine homozygote Mutation auf (c.1300C>T, p.R434X) und zeigt eine schwere und permanente Hypothyreose. Die anderen 3 Patienten hingegen tragen heterozygote Mutationen (Patient 2: c.2056C>T, p.Q686X; Patient 3: c.2101C>T, p.R701X; Patient 4: c.2895\_2898del, p.S965fsX994), welche zu einer mildereren und transienten Form der Hypothyreose führten. Diese Beobachtungen zeigen, dass durch eine homozygote Mutation die Schilddrüsenhormonsynthese wahrscheinlich komplett blockiert wird. Eine heterozygote Mutation führt allerdings nur zu einer reduzierten Wasserstoffperoxid-Produktion und damit zu einer leichteren Hypothyreose, die sich teilweise sogar auf die ersten Lebenswochen bis -monate beschränkt. (61)

Die unter 3.1 beschriebene Patientin A ist heterozygot für die Mutation c.602dup im *DUOX2* Gen. Sie benötigt nur sehr geringe Dosen an L-Thyroxin (25µg/d ab 15 Lebensmonaten bis zum Eintritt in die Pubertät), um eine euthyreote Stoffwechsellage zu erreichen. Auch die durch Moreno et al. beschriebenen Patienten 2, 3 und 4 wurden mit sehr geringen Dosen an L-Thyroxin behandelt (durchschnittlich 1,3 µg pro kg Körpergewicht pro Tag). Bei Patienten mit einer schweren Hypothyreose hingegen wird eine initiale Dosis von 10-15 µg/kgKG pro Tag empfohlen (62). Der Unterschied in der notwendigen Dosierung von L-Thyroxin spricht dafür, dass bei heterozygoten Mutationen im *DUOX2* Gen eine Restfunktion in der Schilddrüsenhormonbiosynthese erhalten bleibt. Auch bei der Patientin B (siehe 3.2) liegt, trotz compound heterozygotem Mutationsstatus im *DUOX2* Gen, eine transiente Hypothyreose vor. Diese kann wahrscheinlich durch die Restfunktion des p.D506N *DUOX2* Proteins erklärt werden (siehe 5.4, 5.5).

Vigone et al. beschreiben zwei Brüder, die beide compound heterozygot für 2 Mutationen im *DUOX2* Gen sind (nonsense Mutation: c.2524C>T, p.Arg842X missense Mutation: c.1126C>T, p.Arg376Trp). Beide zeigen eine milde permanente Hypothyreose. Während beim ersten Bruder bereits das Neugeborenencreening



pathologisch ausfiel, manifestierte sich beim zweiten Bruder die Hypothyreose erst am 11. postnatalen Tag. Dies wurde auf eine höhere Jodzufuhr in der Neonatalphase des zweiten Jungens zurückgeführt. Der *DUOX2*-Phänotyp kann also durch Umweltfaktoren, wie eine Jod-Supplementierung, beeinflusst werden. (63)

Auch bei der hier beschriebenen Patientin A (siehe 3.1) zeigt sich ein unterschiedlicher Phänotyp zwischen Mutter und Tochter, obwohl beide heterozygot für die Mutation c.602dup sind. Eventuell haben auch hier Umweltfaktoren wie die Jodzufuhr einen Einfluss auf den Ausprägungsgrad der Hypothyreose. Ebenso wäre denkbar, dass bei den durch Vigone et al. beschriebenen Brüdern die monoallelische Expression eine Rolle spielt. Eventuell könnte eines der *DUOX2* Allele eine größere Restfunktion besitzen und dieses beim Bruder mit dem milderem Phänotyp vorwiegend transkriptionell aktiv sein.

### **5.6.2 Mutationen im *DUOX2/DUOXA2* bzw. *DUOX1/DUOXA1* System**

*DUOXA2* übernimmt wichtige Funktionen während der Synthese und Reifung von *DUOX2* (siehe 2.4). Durch Mutationen im *DUOXA2* Gen kann dieses Zusammenspiel gestört werden, was ebenfalls zu einer kongenitalen Hypothyreose führen kann.

Zamproni et al. beschreiben zum Beispiel eine Patientin mit einer homozygoten *DUOXA2* Mutation (c.738C>G, p.Y246X). *In vitro* hat das mutierte *DUOXA2* keine Restfunktion, somit kommt es nicht zur Reifung des *DUOX2* Proteins und die Aktivität von *DUOX2* ist reduziert. Klinisch zeigt die Patientin eine permanente milde Hypothyreose. Vier Verwandte des Mädchens sind heterozygot für diese Mutation, zeigen jedoch eine euthyreote Stoffwechsellage. *DUOXA2* Mutationen scheinen folglich rezessiv vererbt zu werden und im Gegensatz zu *DUOX2* Mutationen keine Haploinsuffizienz zu zeigen. (13)

Außerdem ist es möglich, dass *DUOXA1* ebenfalls zur Aktivierung von *DUOX2* führen kann und somit einen Verlust der *DUOXA2* Funktion kompensiert (64). Diese Beobachtungen machten Hular et al. Sie berichten von einem Patienten mit einer missense Mutation (c.565T>C, p.C189R) im maternalen *DUOXA2* Allel sowie einer Deletion im paternalen Allel, welche die genomischen Abschnitte von *DUOX2*, *DUOXA1* und *DUOXA2* umfasst. Reifungsfaktoren der *DUOX* können bei diesem Patienten somit nur durch die einzige funktionierende *DUOXA1* Kopie generiert werden. Dass der Patient trotzdem nur eine transiente Hypothyreose zeigt, spricht ebenfalls dafür, dass *DUOXA1* zumindest teilweise eine Aktivierung von *DUOX2*

bewirken kann und beim Fehlen von DUOX2 dessen Funktion kompensiert. (64) Dies würde erklären, warum der Phänotyp einer homozygoten *DUOX2* Mutation milder ausfällt als der einer homozygoten *DUOX1* Mutation.

Bisher waren nur Mutationen im *DUOX2/DUOX2* System, nicht aber im *DUOX1/DUOX1* System, als Ursache für eine kongenitale Hypothyreose bekannt. Liu et al. identifizierten nun aber eine Patientin mit einer heterozygoten missense Mutation (c.3920G>A, p.R1307Q) in einem hoch konservierten Bereich des *DUOX1* Gens. Sie zeigte eine transiente Hypothyreose, die sich auf das Neonatal- und Kindesalter beschränkte. Außerdem beschreiben sie einen Patienten mit einer heterozygoten missense Mutation (c.166 C>T, p.R56W) im *DUOX1* Gen, welcher eine permanente kongenitale Hypothyreose aufweist. Aufgrund dieser Beobachtungen nahmen Liu et al. an, dass auch Mutationen im *DUOX1/DUOX1* System zu einer kongenitalen Hypothyreose führen können. Sie vermuteten, dass DUOX1 für die maximale Aktivität von DUOX2 benötigt wird und DUOX2 wiederum für die volle Funktionsfähigkeit des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzierenden Systems notwendig ist. Es wäre aber auch möglich, dass Mutationen in anderen Genen, die bei diesen beiden Patienten nicht untersucht wurden, für die Hypothyreose mitverantwortlich sind. (65)

### **5.6.3 In der Literatur beschriebene Spleißmutationen im *DUOX2* Gen**

Varela et al. beschreiben einen Patienten mit einer compound heterozygoten Mutation im *DUOX2* Gen. Er fiel im Alter von einem Monat mit einer schweren permanenten Hypothyreose auf. Er zeigte eine prolongierte Gelbsucht, ein Myxödem im Gesicht, eine große hintere Fontanelle, eine Nabelhernie sowie eine Struma. Die erste Mutation ist eine Deletion eines Guanins im Exon 11 (c.1253delG), was zu einem Frameshift und Entstehung eines vorzeitigen Stopcodons in Exon 12 führt (p.G418fsX482). Die zweite Mutation stellt eine Adenin-zu-Cytosin-Transversion in der Spleiß-Akzeptorstelle von Intron 19 dar (g.IVS19-2A>C). Dies führt *in vitro* dazu, dass Exon 20 beim Spleißen eliminiert wird. Durch die direkte Verbindung von Exon 19 mit Exon 21 kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters mit der Entstehung eines vorzeitigen Stopcodons im Exon 21. Dies würde zu einem auf 885 Aminosäuren verkürzten Protein führen. (66)

Varela et al. hatten kein Schilddrüsengewebe des Patienten zur Verfügung, um das Spleißverhalten *in vivo* zu analysieren (66). Es müsste also weiter untersucht

werden, ob das Spleißen *in vivo* tatsächlich verändert und damit krankheitsverursachend ist.

Auch die Mutation c.602dup im *DUOX2* Gen führt zum Überspringen eines Exons während des Spleißens, wodurch es zu einer Verschiebung des Leserasters mit Entstehung eines vorzeitigen Stopcodons und dadurch möglicherweise zu einem verkürzten Protein kommt. Allerdings liegt die von Varela et al. beschriebene Mutation in der Spleißakzeptorstelle. Nach Wimmer et al. ist sie somit der ersten Gruppe der Spleißmutationen zugehörig (siehe 2.10). Diese Mutationen verändern die Exon-Intron-Grenzen, sodass diese nicht mehr erkannt werden und das nachfolgende Exon übersprungen wird (34). Die Mutation c.602dup dagegen gehört zur fünften Kategorie der Spleißmutationen, welche Veränderungen in ESEs oder ESSs umfasst (siehe 2.10). Beide Mutationen (g.IVS19-2A>C und c.602 dup) führen also zum Überspringen eines Exons während des Spleißprozesses, dies geschieht jedoch aufgrund verschiedener Mechanismen.

Eine Mutation im *DUOX2* Gen, die wie c.602 dup in Kategorie 5 der Spleißmutationen (siehe 2.10) fällt, wurde durch Cao et al. an einem Bama Schwein beschrieben. Das Schwein ist homozygot für die Mutation c.1226A>G und zeigt erniedrigte T3- und T4- sowie erhöhte TSH-Werte. Durch Isolation von RNA aus dem Schilddrüsengewebe des Schweins, reverser Transkription und Sequenzierung der cDNA wurde gezeigt, dass Exon 10 während des Spleißprozesses übersprungen wird. Dies führt zu einem frameshift mit einem vorzeitigen Stopcodon und einem verkürzten Protein. *In silico* Analysen deuten darauf hin, dass die Mutation c.1226A>G im Bereich eines ESEs liegt und deshalb das Spleißen verändert ist. (67)

Eine weitere Mutation in einer Spleißakzeptorstelle wurde durch Belforte et al. und Muzza et al. beschreiben (c.2335-1G>C) (68) (69). Eventuell existieren noch weitere Mutationen im *DUOX2* Gen, die zu einem veränderten Spleißen führen, bei denen es bislang aber noch nicht bekannt ist. Es wird vermutet, dass oft die veränderte Aminosäurenstruktur durch eine Punktmutation als pathogener Mechanismus vermutet wird, obwohl eine Störung des Spleißens zugrunde liegt (siehe 2.7) (26, 27). Um dies zu überprüfen, müssten die bisher bekannten *DUOX2* Mutationen daraufhin *in silico* und *in vitro* analysiert werden.

## 5.7 Therapeutische Möglichkeiten bei Spleiß-Mutationen

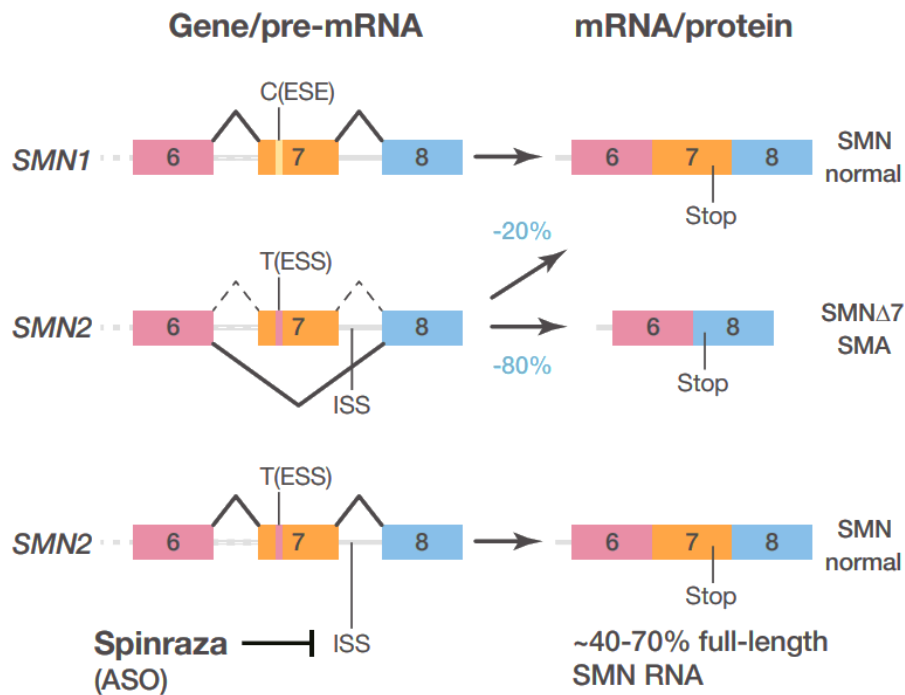
Die Identifikation der molekularen Mechanismen, die zu einer Krankheit führen, ist wichtig, um mögliche Therapien ableiten zu können. Genau dies gelang kürzlich im Fall der Spinalen Muskelatrophie.

Die Spinale Muskelatrophie ist eine seltene, autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung (70). Sie wird in 95 % der Fälle durch eine homozygote Deletion des *survival motor neuron 1 (SMN1)* Gens ausgelöst, wodurch es zu einem Mangel an SMN Protein kommt (70). Das führt zu einem Absterben der Motoneuronen im Rückenmark und Hirnstamm, was zu einer Muskelatrophie und einer zunehmenden Schwäche der Skelett- und Atemhilfsmuskulatur führt (71).

*SMN2* ist das paraloge Gen von *SMN1* und unterscheidet sich von diesem nur durch die Substitution von Cytosin zu Thymin in einem ESE im Exon 7 (70). Das führt dazu, dass 85-90% der reifen mRNA Kopien von *SMN 2* kein Exon 7 enthalten, das entstehende Protein funktionslos ist und abgebaut wird (70).

Patienten mit Spinaler Muskelatrophie besitzen kein funktionierendes *SMN1* Gen mehr, sodass das SMN Protein nur über *SMN2* synthetisiert werden kann (70). Da allerdings nur 10-15% der reifen mRNA Transkripte Exon 7 beinhalten, kommt es zu einem Mangel an SMN Protein (70).

Wan et al. beschreiben das Medikament Nusinersen, welches ein Antisense-Oligonukleotid darstellt. Es bindet auf prä-mRNA Ebene an ein ISS im Intron 7 von *SMN2*. Somit wird die Bindung von Spleiß-Proteinen und damit die Wirkung des ISS verhindert. Infolge dessen kommt es zur vermehrten Integration von Exon 7 in die reife mRNA und einer Entstehung größerer Mengen an funktionierendem *SMN2* Protein (siehe Abbildung 19). (72)



**Abbildung 19: Wirkung des Medikaments Nusinersen**

Das Medikament Nusinersen stellt ein Antisense-Oligonukleotid dar, durch welches die Wirkung eines ISS im *SMN2* Gen abgeschwächt wird und Exon 7 vermehrt in die reife mRNA integriert wird. Abkürzungen: SMN: survival motor neuron, ASO: Antisense-Oligonukleotid

*Bildquelle: Wan L, Dreyfuss G. Splicing-Correcting Therapy for SMA. Cell. 2017;170(1):5*

Durch die bei den Patientinnen vorliegende Mutation c.602dup im Exon 6 des *DUOX2* Gens überwiegen ebenfalls die Faktoren, die eine Integration des Exons in die reife mRNA hemmen (siehe 5.1). Deshalb wäre es denkbar, dass auch hier Medikamente entwickelt werden könnten, die beispielsweise einen nahe gelegenen ISS hemmen und so die Integration von Exon 6 fördern. Allerdings ist die kongenitale Hypothyreose, im Gegensatz zur Spinalen Muskelatrophie, bei rechtzeitiger Diagnosestellung durch die Substitution von L-Thyroxin sehr gut behandelbar. Außerdem würde die Therapie hier nur für sehr wenige Patienten infrage kommen, da sie nur bei Spleißmutationen, die das Exon 6 des *DUOX2* Gens betreffen, wirken würde. Hinzu kommt, dass die Entwicklung und Zulassung solcher Medikamente sehr teuer und aufwendig sind. In naher Zukunft ist deshalb eher nicht mit der Erfindung eines solchen Medikaments zu rechnen. Mit L-Thyroxin existiert bereits eine kostengünstige, gut wirksame und beim breiten Spektrum der kongenitalen Hypothyreose einsetzbare Therapie.

## 5.8 Effekte eines Duox2- Ausfalls bei Knockout-Mäusen

Sirokmány et al. beschreiben den Effekt eines Ausfalls von Duox2 im Mausmodell. Mäuse mit einer homozygoten missense Mutation in *Duox2* entwickeln den typischen Phänotyp einer kongenitalen Hypothyreose. Ebenso zeigte sich dieses Krankheitsbild bei Mäusen, bei denen beide Reifungsfaktoren der Duox-Proteine, Duoxa1 und Duoxa2, inaktiviert wurden. Dies spricht dafür, dass Duox2 eine unersetzbare Funktion in der Schilddrüsenhormonsynthese hat. (73)

Die Expression von *Duox* ist allerdings nicht auf die Schilddrüse begrenzt. Wie bereits unter 2.4 beschrieben, findet sich Duox auch in der Schleimhaut des Respirationstraktes sowie des Gastrointestinaltraktes. Hier erfüllt Duox2 wahrscheinlich eine Rolle in der Immunabwehr: Es wird vermutet, dass das Wasserstoffperoxid, welches durch Duox produziert wird, genutzt wird, um Hypothiocyanat herzustellen. Dieses stellt eine potente antimikrobielle Verbindung dar. (73)

Grasberger et al. zeigten in einer Studie mit Mäusen, dass eine Infektion mit *Helicobacter felis* zu einer Induktion von *Duox2* und *Duoxa2* und somit zu einer erhöhten Produktion an  $H_2O_2$  führt. In *Duoxa1*<sup>-/-</sup> *Duoxa2*<sup>-/-</sup> Mäusen hingegen konnte nur sehr wenig extrazelluläres  $H_2O_2$  gemessen werden. Daher scheinen die Duox Proteine die Hauptquelle für Wasserstoffperoxid im murinen Magen zu sein. Die verminderte Konzentration an  $H_2O_2$  führte dazu, dass *Duoxa*<sup>-/-</sup> Mäuse eine erhöhte Kolonisation mit *Helicobacter felis* und eine gesteigerte Entzündungsreaktion zeigten. Duox2 spielt bei der Maus folglich eine wichtige Rolle in der Immunabwehr des Gastrointestinaltraktes. (74)

In den Atemwegen scheinen Duox1 und 2 eine allergische Reaktion zu begünstigen (75).

Laut Holgate versteht man unter dem Begriff des allergischen Asthma bronchiale eine Krankheit mit einer anfallsweisen Obstruktion der Atemwege durch eine Hyperreagibilität des Bronchialsystems. Sie beginnt meist im Kindesalter durch eine Sensibilisierung auf typische Allergene wie Hausstaubmilben, Schimmelpilze oder Pollen. Diese entsteht durch die selektive Vermehrung von T-Lymphozyten, vor allem von T-Helferzellen vom Typ 2 (T<sub>H2</sub>), welche Zytokine wie Interleukin (IL) -3,-4,-5,-9

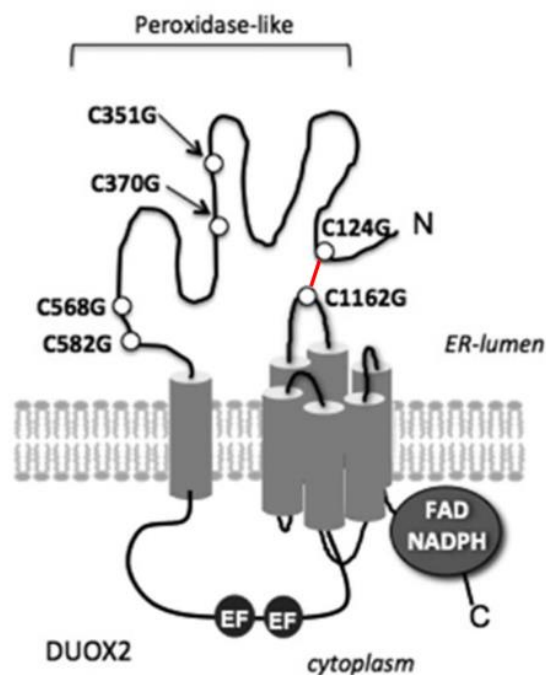
und -13 ausschütten. Folglich kommt es zu einer Aktivierung der allergischen Kaskade, welche zu einer chronischen Entzündung der Atemwege führt: Es kommt zu einer Vermehrung der T<sub>H</sub>2-Zellen, B-Lymphozyten produzieren vermehrt IgE-Antikörper und der Anteil an Mastzellen sowie eosinophilen und basophilen Granulozyten steigt. Diese Entzündungsreaktion führt unter anderem zu einer Becherzellmetaplasie, einer Proliferation der glatten Muskelzellen und einer zunehmenden Fibrosierung im Bronchialsystem. (76)

Die Hypothese von Chang et al., dass die DUOX-Proteine eine wichtige Rolle in der Pathogenese des allergischen Asthmas spielen, beruht auf zwei Beobachtungen: Zum einen wird die Aktivität der DUOX-Proteine über IL-4 und -13 reguliert, welche wichtige Signalstoffe des allergischen Asthmas darstellen. Zum anderen beeinflusst das von DUOX produzierte Wasserstoffperoxid mehrere Merkmale des Asthmas, zum Beispiel steigert es die Muzin Produktion und die IL-8 Sekretion. (75)

Um dieser Hypothese nachzugehen, führten Chang et al. eine Studie mit *Duoxa*<sup>-/-</sup> Mäusen durch, welche weder funktionstüchtiges Duox1 noch Duox2 exprimierten. Hierfür erfolgte vorerst eine Sensibilisierung der Mäuse auf Ovalbumin durch intraperitoneale Injektionen von Ovalbumin gelöst in einer Kaliumaluminiumsulfatlösung. Die allergische Reaktion wurde durch die Exposition gegenüber einem Aerosol mit 1% Ovalbumin ausgelöst. Anschließend wurden die *Duoxa*<sup>-/-</sup> Mäuse hinsichtlich ihrer bronchialen Hyperreagibilität, eosinophilen Entzündung und Becherzellmetaplasie mit Wildtyp Mäusen verglichen. So wurde gezeigt, dass Mäuse, welche Duox exprimieren, sowohl eine gesteigerte bronchiale Hyperreagibilität als auch eine vermehrte Becherzellmetaplasie aufweisen. Außerdem scheint das durch Duox produzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Chemotaxis für neutrophile Granulozyten zu wirken. (75)

## 5.9 Räumliche Struktur von DUOX2

DUOX2 besitzt eine lange extrazelluläre N-terminale Domäne, welche auch als Peroxidase-ähnliche Domäne bezeichnet wird (siehe 2.4). Diese beinhaltet 5 Cystein-Reste, welche sowohl eine wichtige Rolle für die räumliche Struktur des Proteins als auch für die Interaktion mit seinem Reifungsfaktor DUOXA2 spielen. (siehe Abbildung 20). Carré et al. untersuchten die Funktion dieser Cystein-Reste, indem sie sie durch Glycin-Reste ersetzen. (77)



### Abbildung 20: Intramolekulare Disulfidbrücke in DUOX2

Die Abbildung zeigt schematisch die Struktur von DUOX2 in der Zellmembran. Die extrazelluläre Domäne von DUOX2 wird auch als Peroxidase-ähnliche Domäne bezeichnet. Die Ziffern beschreiben jeweils die Position des jeweiligen Cystein-Restes, welcher durch einen Glycin-Rest ersetzt wird. In rot wird die Disulfidbrücke zwischen den Cystein-Resten dargestellt. Abkürzungen: FAD: Flavin-Adenin-Dinukleotid, NADPH: Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

*Bildquelle: modifiziert nach: Carré A, Louzada RAN, Fortunato RS, Ameziane-El-Hassani R, Morand S, Ogryzko V, et al. When an Intramolecular Disulfide Bridge Governs the Interaction of DUOX2 with Its Partner DUOXA2. Antioxid Redox Signal. 2015;23(9):724-33*



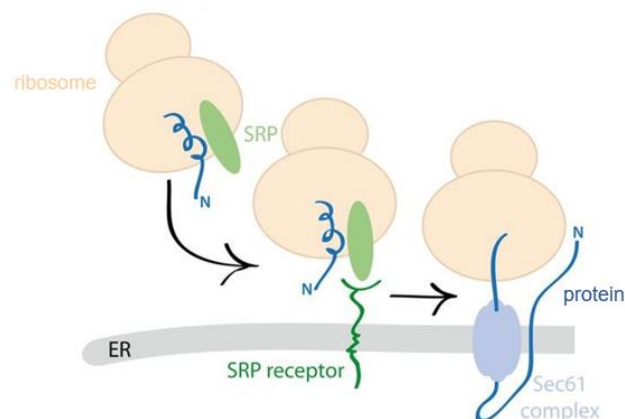
Carré et al. zeigten, dass zwischen den Cystein-Resten an Position 124 und 1162 eine intramolekulare Disulfidbrücke besteht (siehe Abbildung 20). Diese verbindet die N-terminale Domäne mit der extrazellulären Schleife zwischen zwei Transmembransegmenten. Somit bringt sie Anteile des Proteins, die in der linearen Sequenz weit voneinander entfernt liegen, räumlich nah zueinander. Diese Disulfidbrücke scheint essenziell für die Funktion und Struktur von DUOX2 zu sein: Durch das Ersetzen des Cystein-Restes in einen Glycin-Rest an Position 124 kommt es zum Erliegen der  $H_2O_2$  Produktion. Außerdem zeigt sich in der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), im Gegensatz zum Wildtyp Protein, keine Veränderung der Wanderungsgeschwindigkeit, wenn das Redox-Potenzial variiert wird. Dies spricht dafür, dass im DUOX2 Wildtyp Protein eine Disulfidbrücke besteht, welche sich unter reduzierenden Bedingungen wieder löst. Im mutierten DUOX2 Protein (C124G) existiert keine Disulfidbrücke und die Wanderungsgeschwindigkeit ist, unabhängig vom Redox-Potenzial der Umgebung, immer dieselbe. (77)

Durch die Mutation c.602dup könnte es theoretisch zu einem Frameshift kommen, was zur Entstehung eines vorzeitigen Stopcodons mit Abbruch der Translation an Position 299 führt. Außerdem wäre es möglich, dass es, wie *in vitro* nachgewiesen, durch die Spleißmutation zu einem Fehlen von Exon 6 kommt, woraus wiederum ein neues Stopcodon und ein verkürztes Protein mit 252 Aminosäuren entsteht (siehe 4.6). Beides würde dazu führen, dass zwar der Cystein-Rest an Position 124, nicht aber der an Position 1162, erhalten bleibt. Somit könnte sich keine intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden, was wahrscheinlich in einer stark veränderten Struktur und reduzierten  $H_2O_2$  Produktion resultieren würde.

## 5.10 Mögliche Auswirkung der Mutation c.602dup auf die subzelluläre Lokalisation des DUOX2 Proteins

Damit ein Protein seine Funktion im menschlichen Körper erfüllen kann, muss es in das richtige Kompartiment oder in die richtige Organelle transportiert werden. Transmembranproteine wie DUOX2 durchlaufen hierzu den sekretorischen Weg. Das durch die Translation am Ribosom entstehende Protein weist am Beginn der Sequenz ein Erkennungssignal auf, das durch die *signal recognition particle* (SRP) gebunden wird. Daraufhin wird der Komplex zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert und die weitere Proteinsynthese findet an der ER-Membran statt (siehe Abbildung 21). (78)

Dort erfolgt die Insertion der Transmembrandomänen in die Zellmembran. Die ER-Membran enthält das Translokon Sec61, durch welches die entstehende Proteinkette die Membran durchquert. Erkennt das Translokon das Polypeptid-Segment als Transmembrandomäne, kann es das Translokon seitlich verlassen und in die ER-Membran integriert werden (siehe Abbildung 21). Nachdem das Protein vollständig in die ER-Membran integriert wurde, wird es mithilfe von COPII Vesikeln zum Golgi-Apparat transportiert. (79) Dort werden cytosolische Domänen der Transmembranproteine von Transport-Molekülen erkannt. Diese veranlassen eine Verpackung der Proteine in Vesikel und den Transport an die Zellmembran. (80)



**Abbildung 21: Synthese eines Transmembranproteins**

Transmembranproteine werden während ihrer Synthese am Ribosom von einem *signal recognition particle* (SRP) gebunden, zur Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert und dort über das Translokon Sec61 in die ER-Membran integriert.

*Bildquelle: modifiziert nach Barlowe CK, Miller EA. Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. Genetics. 2013;193(2):383-410.*

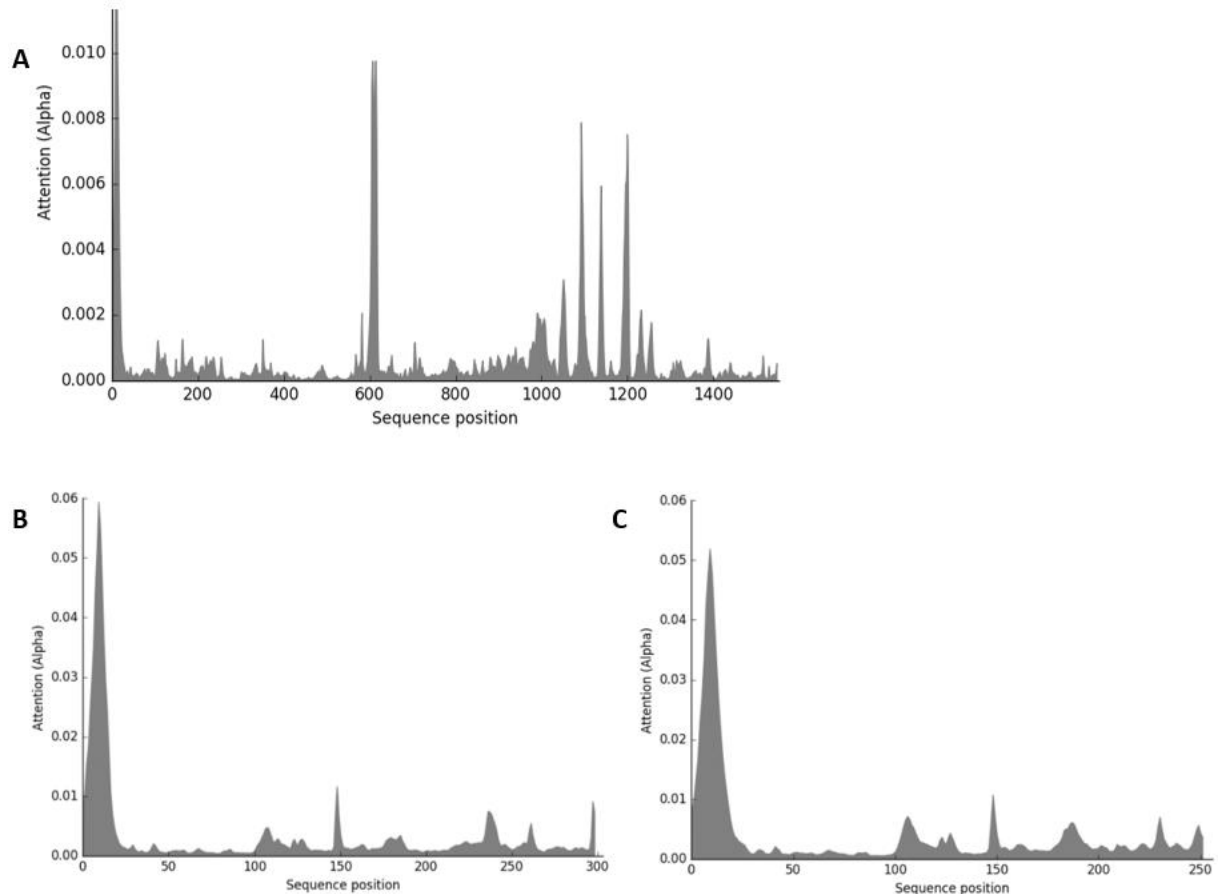
Dass auch DUOX2 diesen Weg durchläuft, demonstrieren Grasberger et. al. mithilfe von Immunfluoreszenz und *Fluorescence-activated Cell Sorting* (FACS). DUOX2 wurde sowohl im ER als auch an der Zellmembran gefunden. Im Golgi-Apparat hingegen wurde kein DUOX2 nachgewiesen, was vermutlich an der relativ kurzen Passagezeit des Proteins durch den Golgi-Apparat liegt. (58)

Durch eine Mutation könnten die Signale, die für den korrekten Transport des DUOX2 Proteins an die Zellmembran wichtig sind, verändert werden. Dies könnte dazu führen, dass der Transport des Proteins an seinen Zielort nicht erfolgen und die Funktion beeinträchtigt sein kann. Um zu untersuchen, ob die Mutation c.602dup den Transport an die Zellmembran stören könnte, wurde das Vorhersageprogramm DeepLoc verwendet. Dieses analysiert mithilfe von künstlicher Intelligenz die Aminosäuresequenz und erkennt so mögliche Transportsignale (81).

Das Wildtyp Protein DUOX2 wird laut DeepLoc mit einer Wahrscheinlichkeit von 97% an die Zellmembran transportiert. Zusätzlich erfolgt bei DeepLoc eine graphische Darstellung, an welchen Positionen des Proteins wichtige Erkennungssequenzen für den Transport an die Zellmembran liegen (siehe Abbildung 22A). Die Höhe der Balken (attention (alpha)) gibt an, wie wichtig dieser Bereich der Sequenz für die Einordnung, wohin das Protein transportiert wird, ist (81).

Anschließend wurden die Proteinvarianten, die durch das vorzeitige Stopcodon und die Spleiß-Mutation entstehen könnten, analysiert. Hier zeigte sich, dass beide Proteine nicht mehr an die Zellmembran transportiert werden. Stattdessen sagt das Programm DeepLoc voraus, dass die Proteine extrazellulär lokalisiert seien. Auch hier wurden die Positionen der wichtigen Erkennungssequenzen graphisch dargestellt (siehe Abbildung 22B + 22C).

Durch die Mutation c.602dup ist das DUOX2 Protein wahrscheinlich auf 299 bzw. 252 Aminosäuren verkürzt (siehe 4.6). Da die Peroxidase-ähnliche Domäne des Wildtyp Proteins beinahe die ersten 600 Aminosäuren umfasst (siehe 4.7), beginnt die erste Transmembrandomäne vermutlich erst bei Sequenzposition 600. Bei Betrachtung von Abbildung 22A fällt auf, dass viele der Erkennungssequenzen erst ab der Sequenzposition 600 auftreten. Dies lässt vermuten, dass durch den Wegfall der Transmembrandomänen wichtige Signale für die Integration in die Zellmembran fehlen.



### Abbildung 22: Position der wichtigen Erkennungssequenzen für den Transport der DUOX2 Proteine

Die Abbildung zeigt, an welchen Positionen wichtige Erkennungssequenzen für den Transport des DUOX2 Proteins liegen. Oben (A) sind die Sequenzen des Wildtyp DUOX2 zu sehen. Links (B) finden sich die Sequenzen des mutierten DUOX2 Proteins, das theoretisch durch den Frameshift entstehen könnte und aus 299 Aminosäuren besteht (p.Gln202Thrfs\*99). Rechts (C) ist das Ergebnis der Analyse des DUOX2 Proteins, das durch die Spleißmutation entsteht und wahrscheinlich 252 Aminosäuren lang ist. Die Höhe der Balken (Attention (alpha)) repräsentiert, wie wichtig diese Erkennungssequenz für den Transport in die richtige subzelluläre Lokalisation ist.

*Bildquelle: erstellt mithilfe von DeepLoc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc-1.0/>)*

Am Beginn der Sequenz sagt DeepLoc wichtige Signale für den Transport des Proteins voraus (siehe Abbildung 22). Dies könnte die Sequenz am Beginn eines Proteins repräsentieren, welche vom SRP gebunden wird und für den Eintritt des Proteins in den sekretorischen Weg verantwortlich ist. Damit wäre auch zu erklären,

warum DeepLoc die Position des mutierten Proteins als extrazellulär beschreibt. Das Protein könnte durch die Bindung des SRP zwar zum ER transportiert werden, dort würde es aber, durch den Wegfall der Transmembrandomänen, nicht in die Membran integriert werden. Folglich würden im Golgi-Apparat die Signale für den Transport zur Zellmembran fehlen. Da auch keine Signale für den Transport des Proteins z.B. in das Lysosom vorhanden sind, sagt DeepLoc eine Sekretion des Proteins in den extrazellulären Raum vorher.

Tatsächlich wurde allerdings beobachtet, dass mutierte DUOX2 Proteine oft im ER verbleiben und nicht in den Golgi-Apparat transportiert werden. Grasberger et al. zeigten dies dadurch, dass die N-Glykan-Reste der mutierten Proteine sensitiv gegenüber einer Deglykosylierung mit Endoglykosidase H blieben. Das Wildtyp Protein hingegen wurde, im Beisein von DUOXA2, im Golgi-Apparat posttranslational modifiziert und war damit resistent gegen eine Deglykosylierung. (58)

Ob auch die hier vorliegende Mutation zu einer Retention des Proteins im ER führt, müsste experimentell überprüft werden. Hierfür könnte zum einen wie bei Grasberger et al. die Resistenz gegenüber der Endoglykosidase H untersucht werden. Zum anderen könnte eine Lokalisationsbestimmung mithilfe von Immunfluoreszenz und FACS durchgeführt werden. Bestätigen sich die Ergebnisse aus der *in silico* Analyse und die mutierten DUOX2 Proteine werden nicht in die Zellmembran integriert, hätte das Protein vermutlich keine Restfunktion.

### **5.11 Interaktion von DUOX2 mit seinem Reifungsfaktor DUOXA2**

DUOXA2 ist der Reifungsfaktor von DUOX2 und wird benötigt, damit DUOX2 das Endoplasmatische Retikulum verlassen und an die Zelloberfläche transportiert werden kann (14). Dort angekommen bilden die beiden Proteine einen Komplex, welcher enzymatisch aktiv ist (82).

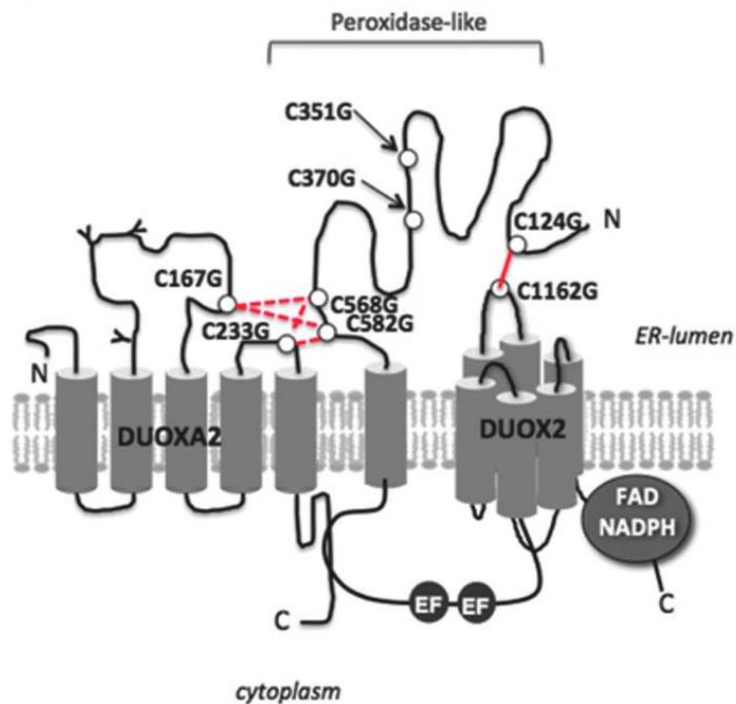
Das *DUOXA2* Gen umfasst 6 Exons und codiert für ein Protein, welches aus 320 Aminosäuren besteht und fünf Transmembransegmente beinhaltet (14). Zwischen dem 2. und 3. Segment liegt eine große extrazelluläre Schleife, welche drei Stellen aufweist, an denen eine N-Glykosylierung stattfinden kann (siehe Abbildung 23) (14).

Grasberger et al. untersuchten, ob DUOXA2 die Bildung der intramolekularen Disulfidbrücke in DUOX2 unterstützt. Hierfür wurde die Mobilität in der SDS-PAGE der oxidierten Formen von DUOX2 verglichen, welche in Anwesenheit und in Abwesenheit von DUOXA2 synthetisiert wurden. Hier zeigten sich keine Unterschiede, was dafür spricht, dass DUOXA2 nicht an der Bildung der Disulfidbrücke beteiligt ist. Wäre die Bildung der Disulfidbrücke von DUOXA2 abhängig, würden sich bei den Proteinen, die ohne den Reifungsfaktor entstanden sind, unvollständige oder fehlerhafte Disulfidbrücken bilden. Dies würde mit einer veränderten Mobilität einhergehen. (58)

Carré et al. zeigten außerdem, dass sowohl der Transport an die Zellmembran als auch die Funktion des Reifungsfaktors DUOXA2 von einem korrekt gefalteten DUOX2 abhängig ist. Wird die Bildung der intramolekularen Disulfidbrücke in DUOX2 unterdrückt, wird DUOXA2 vermehrt im Proteasom abgebaut. Doch selbst wenn dieser Abbau inhibiert wird, kann DUOXA2 nicht an die Zelloberfläche transportiert werden und verbleibt im Endoplasmatischen Retikulum. Die Funktion von DUOXA2 ist also abhängig von der richtigen Faltung der N-terminalen Ektodomäne von DUOX2. (77)

Zudem untersuchten Carré et al. den molekularen Mechanismus der beschriebenen Interaktion zwischen DUOX2 und DUOXA2. Zwei Disulfidbrücken stellen eine kovalente Bindung zwischen den Proteinen her. Diese bestehen zwischen den Cystein-Resten an Position 568 und 582 in DUOX2 und den Cystein-Resten an Position 167 und 233 in DUOXA2 (siehe Abbildung 23). Diese haben eine wichtige Rolle bei Transport und Funktion des DUOX-Komplexes. (77)

Durch die Mutation c.602dup können sich die intermolekularen Disulfidbrücken zwischen DUOX2 und DUOXA2 nicht mehr ausbilden, da es zu einem Translationsabbruch nach Position 252 bzw. 299 kommt. Somit sind die Cysteinreste an Position 568 und 582, welche für die Ausbildung der Disulfidbrücken verantwortlich sind, nicht mehr vorhanden. Der Transport an die Zellmembran und die Funktion des Komplexes aus DUOX2 und DUOXA2 ist durch die Mutation c.602dup deswegen wahrscheinlich stark gestört.



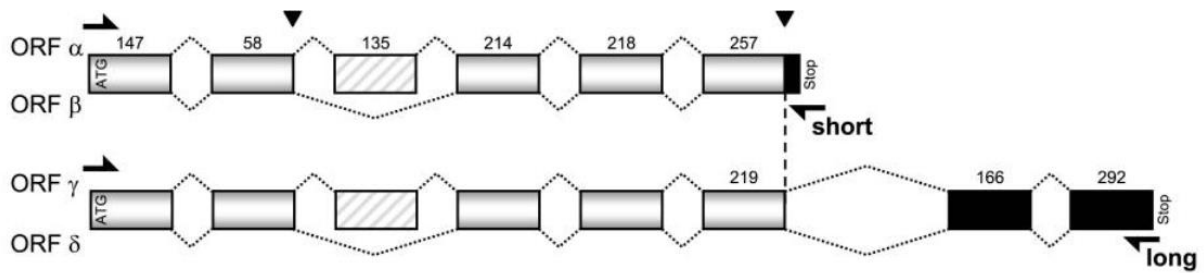
**Abbildung 23: Schematische Darstellung der Struktur und der Disulfidbrücken zwischen DUOX2 und DUOXA2**

Die Abbildung zeigt schematisch die Struktur von DUOX2 und DUOXA2 in der Zellmembran. Die Ziffern beschreiben die Position des jeweiligen Cystein-Restes, welcher durch einen Glycin-Rest ersetzt wurde. Die rote durchgezogene Linie repräsentiert die unter 5.9 beschriebene intramolekulare Disulfidbrücke. Die gestrichelten roten Linien verdeutlichen die intermolekularen Disulfidbrücken zwischen DUOX2 und DUOXA2. Abkürzungen: FAD: Flavin-Adenin-Dinukleotid, NADPH: Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

*Bildquelle: Carré A, Louzada RAN, Fortunato RS, Ameziane-El-Hassani R, Morand S, Ogryzko V, et al. When an Intramolecular Disulfide Bridge Governs the Interaction of DUOX2 with Its Partner DUOXA2. Antioxid Redox Signal. 2015;23(9):724-33*

## 5.12 Interaktion von DUOXA1 mit DUOX2

DUOXA1 ist der Reifungsfaktor von DUOX1, kann aber vermutlich zumindest teilweise auch die Reifung von DUOX2 unterstützen (siehe 5.6.2) (64). Morand et al. führten hierzu *in vitro* Untersuchungen durch. Sie identifizierten vier verschiedene DUOXA1 Varianten, welche durch alternatives Spleißen an zwei Positionen entstehen (siehe Abbildung 24). Im offenen Leseraster (open reading frame= ORF)  $\alpha$  und  $\gamma$  wird das dritte Exon beibehalten, während es im ORF  $\beta$  und  $\delta$  übersprungen wird. Durch alternatives Spleißen im sechsten Exon entstehen die OFR  $\gamma$  und  $\delta$ , welche zwei zusätzliche Exons enthalten. DUOXA1 $\alpha$  ähnelt DUOXA2 am meisten. DUOXA1 $\gamma$  ist an der asymmetrischen Zellteilung beteiligt. (82)



**Abbildung 24: Schematische Darstellung der Spleißvarianten von DUOXA1**

Die Abbildung zeigt die durch alternatives Spleißen entstandene Varianten des Reifungsfaktors DUOXA1. Die Ziffern geben jeweils die Größe des Exons als Anzahl der Nukleotide wieder. Das Symbol ▼ markiert die Stellen, an welchen Alternatives Spleißen stattfindet, ▲ zeigt die Positionen der zur Amplifikation verwendeten Primer. Die schwarz markierten Abschnitte stellen die C-terminalen Sequenzen dar, die sich zwischen ORF α und β sowie γ und δ unterscheiden. Abkürzung: ORF: open reading frame

*Bildquelle: Morand S, Ueyama T, Tsujibe S, Saito N, Korzeniowska A, Leto TL. Duox maturation factors form cell surface complexes with Duox affecting the specificity of reactive oxygen species generation. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2009;23(4):1205-18*

Morand et al. zeigten, dass DUOX2 von drei Reifungsfaktor-Varianten (DUOXA1α, DUOXA1γ und DUOXA2) an die Zelloberfläche transportiert werden konnte, wobei DUOXA1α und DUOXA2 effizienter waren als DUOXA1γ. Trotz der nahezu gleich hohen Oberflächen-Expression mit den Partnern DUOXA1α und DUOXA2 war die Rate an produziertem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei Koexpression von DUOX2 mit DUOXA2 höher als bei Expression mit DUOXA1α. (82)

Außerdem wurde beobachtet, wie gut die Reifung der Duox Proteine und ihrer Reifungsfaktoren im Golgi-Apparat funktioniert. Hier zeigte sich ebenfalls, dass das zusammengehörende Paar Duox2/Duoxa2 effizienter glykosyliert wurde. (82)

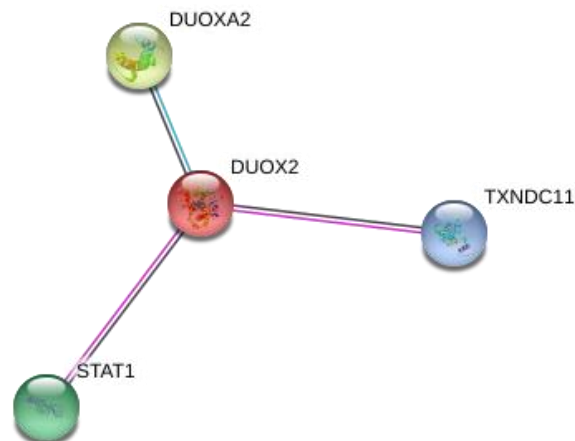
Sowohl der Transport, die Reifung im Golgi-Apparat und die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion funktionierte bei dem zusammengehörenden Duox2/Duoxa2 Paar am effizientesten. Bei Verwendung nicht zusammengehörender Paare erfolgte die Reifung und der Transport weniger effizient und die Rate an gebildetem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> war geringer. (82)

Dass trotzdem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generiert werden konnte, unterstützt die Hypothese, dass DUOXA1 den Ausfall von DUOXA2 zumindest teilweise kompensieren kann.



### 5.13 Interaktion von DUOX2 mit weiteren Proteinen

DUOX2 interagiert im menschlichen Körper mit einigen Proteinen, welche in der Abbildung 25 schematisch dargestellt werden. Die Vorhersage dieser Interaktionen erfolgte mithilfe des Programms String (83).



**Abbildung 25: Interaktion von DUOX2 mit weiteren Proteinen**

Die gezeigten Interaktionen werden durch die bunten Linien zwischen den Proteinen dargestellt. Die türkise Linie bedeutet, dass die Interaktion durch Homologievergleich vermutet wird. Interaktionen, die experimentell ermittelt wurden, werden durch pinke Linien repräsentiert. Proteine, die durch schwarze Linien verbunden sind, werden koexprimiert. Interaktionen, die lediglich durch Textmining vorhergesagt wurden, werden nicht dargestellt. Angewandter Konfidenzwert: 0,3. Abkürzungen: DUOX2: Dual oxidase 2, DUOXA2: Dual oxidase maturation factor 2, STAT1: Signal transducer and activator of transcription 1, TXNDC11: thioredoxin domain containing protein 11

*Bildquelle: Ergebnis der Analyse mit dem Vorhersageprogramm String (<https://string-db.org/>)*

Es scheint, dass DUOX2 nicht nur mit seinem Reifungsfaktor DUOXA2 (siehe 5.11), sondern auch mit STAT1 und TXNDC11 interagiert.

*Signal transducer and activator of transcription 1* (STAT 1) ist ein Transkriptionsfaktor, der in der Zelle viele wichtige Aufgaben übernimmt. Er spielt eine Rolle in der Immunantwort, reguliert die Zelldifferenzierung, fördert die Apoptose und hemmt die Zellteilung (84). Aufgrund dieser Funktionen wird STAT1 oft als Tumorsuppressor bezeichnet, allerdings weisen andere Studien darauf hin, dass

STAT1 auch an der Entstehung und Progression von menschlichen Tumoren beteiligt sein kann (84).

Die Interaktion von DUOX2 mit STAT1 wurde in Pankreaskarzinomzellen beobachtet (85). Wu et al. zeigten, dass Interferon- $\gamma$  die Expression von DUOX2 und DUOXA2 steigert. Dies spiegelte sich auch in einer erhöhten Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wieder. Als molekularen Mechanismus für die Steigerung der Expression wurde ein STAT1-abhängiger Weg identifiziert: INF- $\gamma$  bindet an seine Rezeptoren IFNGR1 und IFNGR2 an der Zelloberfläche, was zur Oligomerisierung dieser Rezeptoren führt. Dies wiederum bewirkt eine Aktivierung der Tyrosinkinase Jak1 und Jak2, welche den Tyrosin-Rest an Position 701 von STAT1 phosphorylieren. Daraufhin kann STAT1 ein Homodimer bilden, welches in den Zellkern transportiert wird. Der Komplex kann nun im Zellkern an den Promotor von DUOX2 binden und so die Genexpression von DUOX2 steigern. (85)

Wu et al. vermuten, dass eine chronische Entzündung des Pankreas die Entstehung von Pankreaskarzinomen begünstigt. Dies könnte durch die erhöhte Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies, angeregt durch die INF- $\gamma$ -Ausschüttung während einer Entzündung, bedingt sein. ROS könnten zum einen zu einer genomischen Instabilität führen. Zum anderen könnten sie die Tumorsuppressor-Funktion von Serin-/Threonin- und Tyrosin-Phosphatasen einschränken und somit eine maligne Transformation und Zellproliferation fördern. (85)

Wang et al. fanden mithilfe eines Hefe-Zwei-Hybrid-Systems heraus, dass *EF-hand binding protein 1* (EFP1) mit DUOX2 interagiert. EFP1 wird auch als *Thioredoxin domain containing protein 11* (TXNDC11) bezeichnet und beinhaltet zwei Thioredoxin-Domänen. Diese spielen bei Redox-Reaktionen eine wichtige Rolle, da die Disulfidbrücke in ihrem aktiven Zentrum reversibel reduziert werden kann. (86)

Die Interaktion zwischen EFP1 und DUOX2 findet an der ersten intrazellulären Schleife von DUOX2, wo die beiden EF-Hand-Motive sitzen, statt (86). Welche Rolle EFP1 in der Schilddrüse spielt, ist unklar. Wang et al. vermuteten, dass EFP1 die Funktion eines Chaperons übernehmen und für die Proteinfaltung und -reifung sowie für die Bildung eines Proteinkomplexes an der Zellmembran verantwortlich sein könnte. Allerdings zeigte sich, dass eine Co-Transfektion von DUOX mit EFP1 nicht

ausreichte, damit DUOX das ER verlassen, sich in die Zellmembran integrieren und  $H_2O_2$  generieren kann (86). Ein Jahr nach Veröffentlichung der Arbeit von Wang et al. identifizierten Grasberger et al. den Reifungsfaktor DUOXA2. Durch Co-Expression von DUOX2 mit DUOXA2 gelang es zum ersten Mal *in vitro*, dass DUOX2 an die Zellmembran transportiert wurde und  $H_2O_2$  bildete (14). Dass dies ohne die Co-Expression von EFP1 erfolgte, spricht eher gegen eine entscheidende Rolle von EFP1 in der Reifung von DUOX2.

Eine zweite Hypothese von Wang et al. zur Interaktion von EFP1 mit DUOX2 betrifft das Neutralisieren von frei gewordenem  $H_2O_2$ . Für die Synthese der Schilddrüsenhormone werden große Mengen an  $H_2O_2$  benötigt. Dieses kann frei in die Zellen diffundieren und dort Schäden anrichten. Der menschliche Körper hat einige Systeme entwickelt, um sich vor reaktiven Sauerstoffspezies zu schützen. Die Katalase in den Peroxisomen wandelt  $H_2O_2$  beispielsweise in Sauerstoff und Wasser um. EFP1 könnte ebenfalls an dieser Entgiftung von  $H_2O_2$  beteiligt sein. Es könnte der Cofaktor einer Peroxidase sein und bei der Reduktion von  $H_2O_2$  oxidiert werden. So würde eine Disulfidbrücke entstehen, die später wieder mithilfe von NADPH durch eine Reduktase gelöst werden müsste. Bisher konnte die NADPH-Oxidase Aktivität aber noch nicht bewiesen werden. (86)

#### **5.14 Ausblick**

Mithilfe dieser Arbeit wurde *in silico* analysiert, welche Auswirkungen die bei den Patientinnen vorliegende Mutation c.602dup auf das DUOX2 Protein haben könnte. Es wurden mehrere Faktoren identifiziert, die zu einer Veränderung des Spleißverhaltens durch die Mutation c.602dup führen könnten (siehe 4.5). Somit wurde die *in vitro* gemachte Beobachtung des veränderten Spleißens in Lymphozyten (2) und in HeLa Zellen (siehe 4.3) bekräftigt. Ob dies *in vivo* allerdings auch passiert, kann nur im Schilddrüsengewebe der Patientinnen untersucht werden. Dazu müsste aus deren Schilddrüsengewebe RNA isoliert und die vorhandenen DUOX2 Transkripte durch reverse Transkription identifiziert werden. Denkbar wäre auch, dass das Spleißen hier nicht beeinträchtigt wird und das entstehende Protein durch den Frameshift und den dadurch bedingten vorzeitigen Abbruch der Translation verändert ist (siehe 4.6). Wenn im Schilddrüsengewebe der Patientinnen

ebenfalls mRNA gefunden wird, welche das Exon 6 nicht enthält, spricht das für eine Veränderung des Spleißens aufgrund der Mutation c.602dup.

Die monoallelische Expression des *DUOX2* Gens könnte eine Erklärung für die phänotypische Variabilität zwischen Patientin A und ihrer Mutter sein. Um dies zu überprüfen, müsste mRNA aus dem Schilddrüsengewebe der Patientin und der Mutter isoliert werden. Dieses müsste durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und analysiert werden, ob bei der Mutter überwiegend nur das Wildtyp Allel exprimiert wird und das mutierte Allel gar nicht oder nur im geringen Umfang. Ebenso müsste untersucht werden, ob bei der Patientin überwiegend das mutierte Allel exprimiert wird. Da bei der Patientin die Substitution mit Schilddrüsenhormonen direkt nach der Geburt begonnen wurde, entwickelte sich bei ihr keine Struma. Es gibt aktuell deshalb weder bei ihr noch bei der Mutter eine medizinische Indikation zur weiteren Untersuchung des Schilddrüsengewebes mittels Feinnadelaspiration oder zur Thyreoidektomie. Somit steht zurzeit kein Schilddrüsengewebe zur Analyse der Genexpression zur Verfügung. Ob die monoallelische Expression Auswirkungen auf den Phänotyp einer Hypothyreose haben könnte, muss in Zukunft noch weiter untersucht werden. Auch bei weiteren autosomal-dominant vererbten Erkrankungen könnte die monoallelische Expression eine Erklärung für die Variabilität im Schweregrad der Symptome liefern und sollte deshalb weiter untersucht werden (56).

Punktmutationen in proteinkodierenden Abschnitten der Gene mit Substitution einer Aminosäure werden oft als ausreichende Erklärung für den Phänotyp einer Erkrankung gewertet. Allerdings könnten bis zu 50% dieser Mutationen zu einem veränderten Spleißen führen, wodurch das Protein viel stärker verändert wäre (27). *In silico* Analysen könnten ein wichtiges Instrument sein, um bereits bekannte Mutationen als Spleißmutationen zu identifizieren und diese anschließend *in vitro* weiter zu untersuchen.

## 6. Zusammenfassung

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Patientinnen liegt eine Duplikation der Base Guanin an Position 602 der proteinkodierenden cDNA des *DUOX2* Gens vor (c.602dup). Die Patientin A ist für diese Mutation heterozygot. Bei Patientin B liegt eine Compound-Heterozygotie im *DUOX2* Gen vor (c.602dup, c.1516G>A). Klinisch zeigen beide Patientinnen eine milde kongenitale Hypothyreose bei einer Schilddrüsenhormonsynthesestörung. Patientin A wurde bisher dauerhaft mit geringen Dosen von L-Thyroxin (25-50 µg/Tag) behandelt. Bei Patientin B war die Hypothyreose dagegen transient und die Behandlung mit L-Thyroxin konnte nach 26 Monaten beendet werden.

Durch *in silico* Analysen wurde gezeigt, dass es durch die Spleißmutation c.602dup vermutlich zu einem Leserahmenfehler und der Entstehung eines vorzeitigen Stopcodons kommt. Dadurch ist das Protein auf 252 Aminosäuren verkürzt und wichtige Anteile des Proteins, wie die 7 Transmembrandomänen, die EF-Hand-Motive, die NADPH- und die FAD-Bindestelle, fehlen. Außerdem kann sich wahrscheinlich sowohl die intramolekulare Disulfidbrücke innerhalb des *DUOX2* Proteins wie auch die intermolekulare Disulfidbrücke zwischen *DUOX2* und *DUOXA2* nicht ausbilden, was vermutlich zum Erliegen der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion führt. Darüber hinaus kommt es durch die Mutation wohl zu einer Störung des Transports von *DUOX2* an die Zellmembran. Somit scheint das c.602dup mutierte *DUOX2* Protein seine Funktion der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion nicht mehr erfüllen zu können.

Die Ergebnisse der *in silico* Analysen müssten aber durch weitere experimentelle Untersuchungen bestätigt werden. Es müsste untersucht werden, welche der unter 4.5 postulierten Proteine genau für die Veränderung des Spleißens verantwortlich sind. Außerdem müsste der Einfluss der monoallelischen Expression und der *nonsense-mediated mRNA decay* auf den klinischen Phänotyp durch Isolation von RNA aus dem Schilddrüsengewebe der Patientinnen bestätigt werden.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Pohlenz J. Angeborene Schilddrüsenerkrankungen. Pädiatrie up2date. 2011;6(01):63-74.
2. Pfarr N, Korsch E, Kaspers S, Herbst A, Stach A, Zimmer C, et al. Congenital hypothyroidism caused by new mutations in the thyroid oxidase 2 (THOX2) gene. Clin Endocrinol (Oxf). 2006;65(6):810-5.
3. Mohebati A, Shaha AR. Anatomy of thyroid and parathyroid glands and neurovascular relations. Clinical Anatomy. 2012;25(1):19-31.
4. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. The Journal of Clinical Investigation. 2012;122(9):3035-43.
5. Cote GJ, Grubbs EG, Hofmann MC. Thyroid C-Cell Biology and Oncogenic Transformation. Recent Results Cancer Res. 2015;204:1-39.
6. Szinnai G. Genetics of normal and abnormal thyroid development in humans. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism. 2014;28(2):133-50.
7. Nilsson M, Fagman H. Development of the thyroid gland. Development (Cambridge, England). 2017;144(12):2123-40.
8. Carvalho DP, Dupuy C. Thyroid hormone biosynthesis and release. Molecular and cellular endocrinology. 2017;458:6-15.
9. Bizhanova A, Kopp P. Minireview: The sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. Endocrinology. 2009;150(3):1084-90.
10. Gnidehou S, Caillou B, Talbot M, Ohayon R, Kaniewski J, Noel-Hudson MS, et al. Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2004;18(13):1574-6.
11. Bedard K, Krause K-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. Physiological Reviews. 2007;87(1):245-313.
12. Grasberger H, Refetoff S. Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dysmorphogenesis. Current opinion in pediatrics. 2011;23(4):421-8.
13. Zamproni I, Grasberger H, Cortinovic F, Vigone MC, Chiumello G, Mora S, et al. Biallelic inactivation of the dual oxidase maturation factor 2 (DUOXA2) gene as a novel cause of congenital hypothyroidism. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2008;93(2):605-10.

14. Grasberger H, Refetoff S. Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(27):18269-72.
15. Moreno JC, Visser TJ. New phenotypes in thyroid dysmorphogenesis: hypothyroidism due to DUOX2 mutations. *Endocrine development*. 2007;10:99-117.
16. Yoshihara A, Hara T, Kawashima A, Akama T, Tanigawa K, Wu H, et al. Regulation of dual oxidase expression and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by thyroglobulin. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2012;22(10):1054-62.
17. Cardoso-Weide LC, Cardoso-Penha RC, Costa MW, Ferreira AC, Carvalho DP, Santisteban PS. DuOx2 Promoter Regulation by Hormones, Transcriptional Factors and the Coactivator TAZ. *Eur Thyroid J*. 2015;4(1):6-13.
18. Mendoza A, Hollenberg AN. New insights into thyroid hormone action. *Pharmacology & therapeutics*. 2017;173:135-45.
19. Oetting A, Yen PM. New insights into thyroid hormone action. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007;21(2):193-208.
20. Forhead AJ, Fowden AL. Thyroid hormones in fetal growth and parturition maturation. *J Endocrinol*. 2014;221(3):R87-r103.
21. Prezioso G, Giannini C, Chiarelli F. Effect of Thyroid Hormones on Neurons and Neurodevelopment. *Hormone research in paediatrics*. 2018:1-9.
22. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*. 2001;81(3):1097-142.
23. Chaker L, Bianco AC, Jonklaas J, Peeters RP. Hypothyroidism. *Lancet*. 2017;390(10101):1550-62.
24. Krude H, Grüters-Kieslich A. Angeborene Schilddrüsenerkrankungen bei Neugeborenen und Kleinkindern. In: Hiort O, Danne T, Wabitsch M, editors. *Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. p. 1-12.
25. Fisher DA. The importance of early management in optimizing IQ in infants with congenital hypothyroidism. *The Journal of pediatrics*. 2000;136(3):273-4.
26. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature reviews Genetics*. 2002;3(4):285-98.
27. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic acids research*. 2003;31(13):3568-71.

28. Shi Y. Mechanistic insights into precursor messenger RNA splicing by the spliceosome. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2017;18(11):655-70.
29. Matera AG, Wang Z. A day in the life of the spliceosome. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(2):108-21.
30. Shi Y. The Spliceosome: A Protein-Directed Metalloribozyme. *Journal of Molecular Biology*. 2017;429(17):2640-53.
31. Will CL, Luhrmann R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011;3(7).
32. Wang Y, Wang Z. Systematical identification of splicing regulatory cis-elements and cognate trans-factors. *Methods (San Diego, Calif)*. 2014;65(3):350-8.
33. Anna A, Monika G. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J Appl Genet*. 2018;59(3):253-68.
34. Wimmer K, Roca X, Beiglbock H, Callens T, Etzler J, Rao AR, et al. Extensive in silico analysis of NF1 splicing defects uncovers determinants for splicing outcome upon 5' splice-site disruption. *Human mutation*. 2007;28(6):599-612.
35. Smith A, Nelson RJ. Capillary electrophoresis of DNA. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*. 2003;Chapter 10:Unit 10.9.
36. Raponi M, Kralovicova J, Copson E, Divina P, Eccles D, Johnson P, et al. Prediction of single-nucleotide substitutions that result in exon skipping: identification of a splicing silencer in BRCA1 exon 6. *Human mutation*. 2011;32(4):436-44.
37. Zhang XH, Chasin LA. Computational definition of sequence motifs governing constitutive exon splicing. *Genes & development*. 2004;18(11):1241-50.
38. Wang Z, Rolish ME, Yeo G, Tung V, Mawson M, Burge CB. Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers. *Cell*. 2004;119(6):831-45.
39. Fairbrother WG, Yeh RF, Sharp PA, Burge CB. Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science*. 2002;297(5583):1007-13.
40. Fairbrother WG, Yeo GW, Yeh R, Goldstein P, Mawson M, Sharp PA, et al. RESCUE-ESE identifies candidate exonic splicing enhancers in vertebrate exons. *Nucleic acids research*. 2004;32(Web Server issue):W187-90.
41. Stadler MB, Shomron N, Yeo GW, Schneider A, Xiao X, Burge CB. Inference of splicing regulatory activities by sequence neighborhood analysis. *PLoS Genet*. 2006;2(11):e191.
42. Zhang C, Li WH, Krainer AR, Zhang MQ. RNA landscape of evolution for optimal exon and intron discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(15):5797-802.



43. Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic acids research*. 2003;31(13):3784-8.
44. Piva F, Giulietti M, Nocchi L, Principato G. SpliceAid: a database of experimental RNA target motifs bound by splicing proteins in humans. *Bioinformatics*. 2009;25(9):1211-3.
45. Reches A. Fragile X Syndrome: Introduction. *Methods Mol Biol*. 2019;1942:3-10.
46. Siomi H, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G. The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell*. 1993;74(2):291-8.
47. Yamamoto K, Furukawa MT, Fukumura K, Kawamura A, Yamada T, Suzuki H, et al. Control of the heat stress-induced alternative splicing of a subset of genes by hnRNP K. *Genes Cells*. 2016;21(9):1006-14.
48. Ule J, Stefani G, Mele A, Ruggiu M, Wang X, Taneri B, et al. An RNA map predicting Nova-dependent splicing regulation. *Nature*. 2006;444(7119):580-6.
49. Goina E, Skoko N, Pagani F. Binding of DAZAP1 and hnRNPA1/A2 to an exonic splicing silencer in a natural BRCA1 exon 18 mutant. *Mol Cell Biol*. 2008;28(11):3850-60.
50. Fakhr E, Zare F, Teimoori-Toolabi L. Precise and efficient siRNA design: a key point in competent gene silencing. *Cancer Gene Ther*. 2016;23(4):73-82.
51. Pilz S, Theiler-Schwetz V, Malle O, Steinberger E, Trummer C. Hypothyreose: Guidelines, neue Erkenntnisse und klinische Praxis. *Journal für Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel*. 2020;13(3):88-95.
52. Gimelbrant A, Hutchinson JN, Thompson BR, Chess A. Widespread monoallelic expression on human autosomes. *Science*. 2007;318(5853):1136-40.
53. Bartolomei MS, Ferguson-Smith AC. Mammalian genomic imprinting. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011;3(7).
54. Buiting K, Williams C, Horsthemke B. Angelman syndrome - insights into a rare neurogenetic disorder. *Nat Rev Neurol*. 2016;12(10):584-93.
55. Sun BK, Tsao H. X-chromosome inactivation and skin disease. *J Invest Dermatol*. 2008;128(12):2753-9.
56. Gui B, Slone J, Huang T. Perspective: Is Random Monoallelic Expression a Contributor to Phenotypic Variability of Autosomal Dominant Disorders? *Front Genet*. 2017;8:191.

57. Fugazzola L, Cerutti N, Mannavola D, Vannucchi G, Fallini C, Persani L, et al. Monoallelic expression of mutant thyroid peroxidase allele causing total iodide organification defect. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(7):3264-71.
58. Grasberger H, De Deken X, Miot F, Pohlenz J, Refetoff S. Missense Mutations of Dual Oxidase 2 (DUOX2) Implicated in Congenital Hypothyroidism Have Impaired Trafficking in Cells Reconstituted with DUOX2 Maturation Factor. *Molecular Endocrinology*. 2007;21(6):1408-21.
59. Miller JN, Pearce DA. Nonsense-mediated decay in genetic disease: friend or foe? *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2014;762:52-64.
60. Pohlenz J, Rosenthal IM, Weiss RE, Jhiang SM, Burant C, Refetoff S. Congenital hypothyroidism due to mutations in the sodium/iodide symporter. Identification of a nonsense mutation producing a downstream cryptic 3' splice site. *J Clin Invest*. 1998;101(5):1028-35.
61. Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, et al. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *The New England journal of medicine*. 2002;347(2):95-102.
62. van Trotsenburg P, Stoupa A, Léger J, Rohrer T, Peters C, Fugazzola L, et al. Congenital Hypothyroidism: A 2020-2021 Consensus Guidelines Update-An ENDO-European Reference Network Initiative Endorsed by the European Society for Pediatric Endocrinology and the European Society for Endocrinology. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2021;31(3):387-419.
63. Vigone MC, Fugazzola L, Zamproni I, Passoni A, Di Candia S, Chiumello G, et al. Persistent mild hypothyroidism associated with novel sequence variants of the DUOX2 gene in two siblings. *Human mutation*. 2005;26(4):395.
64. Hular I, Hermanns P, Nestoris C, Heger S, Refetoff S, Pohlenz J, et al. A single copy of the recently identified dual oxidase maturation factor (DUOXA) 1 gene produces only mild transient hypothyroidism in a patient with a novel biallelic DUOXA2 mutation and monoallelic DUOXA1 deletion. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(5):E841-5.
65. Liu S, Han W, Zang Y, Zang H, Wang F, Jiang P, et al. Identification of Two Missense Mutations in DUOX1 (p.R1307Q) and DUOXA1 (p.R56W) That Can Cause Congenital Hypothyroidism Through Impairing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Generation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:526.

66. Varela V, Rivolta CM, Esperante SA, Gruneiro-Papendieck L, Chiesa A, Targovnik HM. Three mutations (p.Q36H, p.G418fsX482, and g.IVS19-2A>C) in the dual oxidase 2 gene responsible for congenital goiter and iodide organification defect. *Clinical chemistry*. 2006;52(2):182-91.
67. Cao C, Zhang Y, Jia Q, Wang X, Zheng Q, Zhang H, et al. An exonic splicing enhancer mutation in DUOX2 causes aberrant alternative splicing and severe congenital hypothyroidism in Bama pigs. *Dis Model Mech*. 2019;12(1).
68. Belforte FS, Citterio CE, Testa G, Olcese MC, Sobrero G, Miras MB, et al. Compound heterozygous DUOX2 gene mutations (c.2335-1G>C/c.3264\_3267delCAGC) associated with congenital hypothyroidism. Characterization of complex cryptic splice sites by minigene analysis. *Molecular and cellular endocrinology*. 2016;419:172-84.
69. Muzza M, Rabbiosi S, Vigone MC, Zamproni I, Cirello V, Maffini MA, et al. The Clinical and Molecular Characterization of Patients With Dys hormonogenic Congenital Hypothyroidism Reveals Specific Diagnostic Clues for DUOX2 Defects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014;99(3):E544-E53.
70. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal Muscular Atrophy. *Neurol Clin*. 2015;33(4):831-46.
71. Messina S. New Directions for SMA Therapy. *J Clin Med*. 2018;7(9).
72. Wan L, Dreyfuss G. Splicing-Correcting Therapy for SMA. *Cell*. 2017;170(1):5.
73. Sirokmany G, Donko A, Geiszt M. Nox/Duox Family of NADPH Oxidases: Lessons from Knockout Mouse Models. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37(4):318-27.
74. Grasberger H, El-Zaatari M, Dang DT, Merchant JL. Dual Oxidases Control Release of Hydrogen Peroxide by the Gastric Epithelium to Prevent *Helicobacter felis* Infection and Inflammation in Mice. *Gastroenterology*. 2013;145(5):1045-54.
75. Chang S, Linderholm A, Franzi L, Kenyon N, Grasberger H, Harper R. Dual oxidase regulates neutrophil recruitment in allergic airways. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:38-46.
76. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med*. 2012;18(5):673-83.
77. Carré A, Louzada RAN, Fortunato RS, Ameziane-El-Hassani R, Morand S, Ogryzko V, et al. When an Intramolecular Disulfide Bridge Governs the Interaction of DUOX2 with Its Partner DUOXA2. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(9):724-33.
78. Barlowe CK, Miller EA. Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics*. 2013;193(2):383-410.

79. Spiess M, Junne T, Janoschke M. Membrane Protein Integration and Topogenesis at the ER. *Protein J.* 2019;38(3):306-16.
80. Guo Y, Sirkis DW, Schekman R. Protein sorting at the trans-Golgi network. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:169-206.
81. Almagro Armenteros JJ, Sonderby CK, Sonderby SK, Nielsen H, Winther O. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics.* 2017;33(21):3387-95.
82. Morand S, Ueyama T, Tsujibe S, Saito N, Korzeniowska A, Leto TL. Duox maturation factors form cell surface complexes with Duox affecting the specificity of reactive oxygen species generation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2009;23(4):1205-18.
83. von Mering C, Jensen LJ, Snel B, Hooper SD, Krupp M, Foglierini M, et al. STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic acids research.* 2005;33:D433-7.
84. Zhang Y, Liu Z. STAT1 in cancer: friend or foe? *Discov Med.* 2017;24(130):19-29.
85. Wu Y, Antony S, Juhasz A, Lu J, Ge Y, Jiang G, et al. Up-regulation and sustained activation of Stat1 are essential for interferon-gamma (IFN-gamma)-induced dual oxidase 2 (Duox2) and dual oxidase A2 (DuoxA2) expression in human pancreatic cancer cell lines. *The Journal of biological chemistry.* 2011;286(14):12245-56.
86. Wang D, De Deken X, Milenkovic M, Song Y, Pirson I, Dumont JE, et al. Identification of a novel partner of duox: EFP1, a thioredoxin-related protein. *The Journal of biological chemistry.* 2005;280(4):3096-103.

## 8. Danksagung

## 9. Tabellarischer Lebenslauf

