

Aktivierung von pathogenem MCT8 mithilfe von Natriumphenylbutyrat in juvenilen Mäusen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. med.

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Meike Helms

aus Bonn

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Eberhard Matthias Schweizer
2. Gutachterin: Prof. Dr. Marieta Ioana Toma

Tag der Mündlichen Prüfung: 04.04.2025

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	Einleitung	10
1.1	Schilddrüsenhormone und ihre Wirkung	10
1.2	Aktivierung und Inaktivierung von Schilddrüsenhormonen	10
1.3	Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse	12
1.4	Die Rolle von Schilddrüsenhormonen in prä- und postnataler Entwicklung	12
1.5	MCT8-Defizienz	13
1.5.1	MCT8 ^{P321L}	15
1.6	Mausmodelle	16
1.6.1	<i>Mct8ko</i>	16
1.6.2	<i>Mct8/Oatp1c1dko</i>	18
1.6.3	<i>Mct8/Dio2dko</i>	19
1.6.4	MCT8 ^{P253L}	19
1.7	Behandlungsansätze	21
1.7.1	Thyreomimetische Substanzen	22
1.7.2	Gentherapie	23
1.7.3	NaPB in der Therapie der MCT8-Defizienz	23
1.7.3.1	Wirkmechanismus endogener und chemischer Chaperone	24
1.7.3.2	Bisheriger Forschungsstand zum Einsatz von NaPB bei MCT8- Defizienz	25
1.8	Zielsetzung	27
2.	Material und Methoden	28
2.1	Material	28
2.1.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und vorgefertigte Reagenziensysteme	28
2.1.2	Software und Geräte	28
2.1.3	Mausmodell	30
2.2	Methoden	30

2.2.1	Genotypisierung	30
2.2.2	Behandlung der Mäuse	31
2.2.3	Probenentnahme	33
2.2.4	Weiterverarbeitung der Proben	33
2.2.5	Proteinbiochemische Methoden	33
2.2.5.1	Western Blot	33
2.2.5.2	Dejodase-Assay	36
2.2.5.3	Bestimmung der Transaminasenaktivität	38
2.2.6	Molekularbiologische Methoden	40
2.2.6.1	Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	40
2.2.6.2	3'-mRNA-Sequenzierung	41
2.2.7	Zellkultur	42
2.2.7.1	MDCK1-Zellen	42
2.2.7.2	Primäre Astrozyten	44
2.2.8	Radioaktive Transportmessungen	46
3.	Ergebnisse	48
3.1	NaPB verbessert Expression und Transportaktivität von MCT8 ^{P321L} in MDCK1-Zellen	48
3.2	Die körperliche Entwicklung von MCT8 ^{P253L} -Mäusen ist nicht beeinträchtigt	49
3.3	Unauffällige Transaminasen im Serum von NaPB-behandelten MCT8 ^{P253L} -Mäusen an Postnataltag 14	51
3.4	Die Expression von MCT8 in MCT8 ^{P253L} variiert in Abhängigkeit vom Zelltyp	52
3.5	Leber- und Nierengewebe von MCT8 ^{P253L} -Mäusen zeigt Zeichen der peripheren Hyperthyreose	53
3.6	Juvenile MCT8 ^{P253L} -Mäuse zeigen eine veränderte Expression T ₃ - regulierter Gene im cerebralen Cortex	56
3.7	Die Expression weiterer Schilddrüsenhormontransporter in Cortex- gewebe von MCT8 ^{P253L} -Mäusen ist nicht verändert	59
3.8	NaPB verbessert die Aufnahme von T ₄ in primäre Astrozyten	60
4.	Diskussion	64

4.1	Unauffällige körperliche Entwicklung von MCT8 ^{P253L} -Mäusen	64
4.2	Die Mutation P253L beeinträchtigt die Expression von MCT8 in Abhängigkeit vom zellulären Kontext	65
4.3	Periphere Hyperthyreose in juvenilen MCT8 ^{P253L} -Mäusen	67
4.4	Cortexgewebe von juvenilen MCT8 ^{P253L} -Mäusen zeigt Anzeichen einer cerebralen Hypothyreose	70
4.5	Expression und Transportfähigkeit von MCT8 ^{P253L} in primären Astrozyten	72
4.5.1	NaPB verbessert die Aufnahme von T ₃ in MCT8 ^{wt} -Astrozyten	72
4.5.2	MCT8 spielt eine untergeordnete Rolle für die Aufnahme von T ₄ in murine Astrozyten	73
4.6	Wirkung von NaPB im MCT8 ^{P253L} -Mausmodell	74
4.6.1	Wirkung von NaPB auf die Expression von MCT8	74
4.6.2	Behandlung mit NaPB hat keinen negativen Einfluss auf die körper- liche Entwicklung von MCT8 ^{P253L} -Mäusen	75
4.6.3	NaBP zeigt keine hepatotoxische Wirkung in MCT8 ^{P253L} -Mäusen	75
4.6.4	Wirkung von NaPB auf periphere Organe	76
4.6.5	Wirkung von NaPB auf neuronales Gewebe	76
5.	Zusammenfassung	79
6.	Abbildungsverzeichnis	81
7.	Tabellenverzeichnis	83
8.	Literaturverzeichnis	84
9.	Erklärung zum Eigenanteil	99
10.	Danksagung	100

Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase
ARD	Außenringdejodierung
AST	Aspartat-Aminotransferase
BHC	2-Aminobicyclo[2.2.1]heptan-2-Carbonsäure
BSA	Serumalbumin, Rind
cDNA	komplementäre DNA
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIO1	Dejodase 1
DIO2	Dejodase 2
DIO3	Dejodase 3
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DSMO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
eIF2 α	<i>eukaryotic initiation factor 2α</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	fetales Kälberserum

fT ₃	Freies T ₃
fT ₄	Freies T ₄
fwd	<i>forward</i>
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GH	Wachstumshormon
GRP	<i>Glucose-regulated protein</i>
HBSS	<i>HANKS' Salt Solution</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
iBMECs	<i>induced Brain Microvascular Endothelial Cells</i>
IRD	Innenringdejodierung
IRE1 α	<i>Inositol requiring enzyme 1 α</i>
LAT	<i>large neutral amino acid transporter</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
MCT8, SLC16A2	Monocarboxylattransporter 8
MCT10, SLC	Monocarboxylattransporter 10
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
MDH	Malatdehydrogenase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natrium-Chlorid
NADP	Nikotinamidadenindinucleotid

NTCP	Natriumtaurocholat-kotransportierendes Polypeptid
OATP	<i>organic anion-transporting polypetid</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDL	Poly-L-Lysinhydrobromid
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rT ₃	reverses 3,3',5'-Trijodthyronin
RT-PCR	<i>real time PCR</i>
SC	Silychristin
scRNA-seq	<i>single-cell RNA Sequencing</i>
SHGB	Sexualhormon-bindendes-Globulin
SLC	<i>solute carrier</i>
SMA	Spinale Muskelatrophie
T ₂	Dijodthyronin
T ₃	3,3',5-Trijodthyronin
T ₄	3,3',5,5'-Tetraiodthyronin, Thyroxin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TR	T ₃ -Rezeptor
TRH	Thyreoliberin, thyrotropin releasing hormone
TRIAC	Trijodessigsäure

TSH	Thyreotropin, Thyreoidea-stimulierendes Hormon
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System

1. Einleitung

1.1 Schilddrüsenhormone und ihre Wirkung

Der Begriff Schilddrüsenhormone umfasst das Prohormon Thyroxin (T_4) und dessen aktiven Metaboliten 3,3',5-Trijodthyronin (T_3). Synthese und Sekretion der Hormone ins Blut erfolgen durch die Schilddrüse und unterliegen einer fein abgestimmten Regulation durch die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse. Im menschlichen Organismus spielen Schilddrüsenhormone eine zentrale Rolle in der Regulation des Energiemetabolismus und der Thermogenese. Darüber hinaus sind sie essentiell für die Differenzierung von Zellen und damit für die Entwicklung ganzer Organe, insbesondere des Nervensystems (Patel et al., 2011). Nur ca. 20 % des biologisch wirksamen T_3 werden direkt von der Schilddrüse sezerniert. Die restlichen 80 % entstehen in peripheren Geweben durch die Konversion von T_4 zu T_3 (Maia et al., 2011). Die Wirkung von T_3 auf Zellebene wird primär durch Bindung des Hormons an den nukleären T_3 -Rezeptor vermittelt. T_3 -Rezeptoren gehören zu den ligandenaktivierten Transkriptionsfaktoren, die ihre Wirkung durch Bindung an die Promotorregion von Zielgenen und Modifikation der Transkription entfalten (Yen, 2001). Anders als lange angenommen, erfolgt die zelluläre Aufnahme der Hormone T_3 und T_4 nicht über Diffusion, sondern benötigt spezifische Transporter (Hennemann et al., 2001). Die effektivsten bisher charakterisierten Transportproteine für Schilddrüsenhormone sind Monocarboxylattransporter 8 (MCT8, SLC16A2), Monocarboxylattransporter 10 (MCT10, SLC16A10), Organic Anion Transporting Polypeptide 14 (OATP1C1, SLCO1C1) und Solute Carrier Family 17 Member 4 (SLC17A4) (Groeneweg, Van Geest, et al., 2019). Die Expression dieser Transporter erfolgt gewebespezifisch. Dadurch verfügen die verschiedenen Organe über ein individuelles Muster von Transportproteinen. Für MCT8 konnte eine starke Expression im menschlichen Hirn-, Leber-, Nieren- und Schilddrüsengewebe nachgewiesen werden (Groeneweg, Van Geest, et al., 2019).

1.2 Aktivierung und Inaktivierung von Schilddrüsenhormonen

Um eine bedarfsgerechte Versorgung einzelner Zellen mit dem biologisch aktiven T_3 sicherzustellen, ist eine fein abgestimmte Regulation durch aktivierende und inaktivierende Enzyme notwendig. Der intrazelluläre Metabolismus von T_3 und T_4 wird durch drei gewebespezifisch exprimierte Isoformen der Jodothyronin-Dejodase (DIO1, DIO2 und DIO3)

katalysiert (Sabatino et al., 2021). Dejodasen sind dimere Transmembranproteine, deren aktives Zentrum die modifizierte Aminosäure Selenocystein enthält. Die Dejodierung von T_3 und T_4 kann am inneren oder am äußeren Phenolring erfolgen. Durch Dejodierung an Position 5' des äußeren Phenolrings (Außenringdejodierung, ARD), erfolgt die Umwandlung des Prohormons T_4 in seinen biologisch aktiven Metaboliten T_3 . Durch Dejodierung des Innenrings an 5'-Position erfolgt die Umwandlung von T_4 in reverses T_3 (rT_3), bzw. die Inaktivierung von T_3 zu 3,3'-Dijodthyronin ($3,3'-T_2$). DIO1 wird vorwiegend in Leber-, Nieren- und Schilddrüsengewebe exprimiert und katalysiert sowohl ARD, als auch IRD. Die DIO1 ist intrazellulär an der Plasmamembran lokalisiert und trägt zur Aufrechterhaltung des Serum- T_3 -Spiegels bei (Sabatino et al., 2021). Darüber hinaus besitzt das Enzym eine hohe Affinität zu rT_3 und sulfatierten Schilddrüsenhormonen und ist daher am Abbau der Jodothyronine und am Recycling von Jod beteiligt (Streckfuß et al., 2005). Die DIO2 wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert und katalysiert ebenfalls die Aktivierung von T_4 zu T_3 durch ARD. Durch ihre intrazelluläre Lokalisation in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER), entsteht T_3 in unmittelbarer Nähe zum Zellkern und damit direkt am Ort der Hormonwirkung. Durch die DIO2 generiertes T_3 verbleibt länger intrazellulär und scheint essentiell für die T_3 -Versorgung von Organen auf zellulärer Ebene zu sein (Sabatino et al., 2021). Die DIO3 wirkt regulierend gegen zu hohe intrazelluläre T_3 -Konzentrationen, indem sie T_3 und T_4 in die inaktiven Metabolite $3,3'-T_2$ und rT_3 umwandelt. In sich entwickelnden, embryonalen Geweben und in Stammzellen ist die DIO3 das dominierende Enzym. Sie schützt Zellen vor zu hohen T_3 -Spiegeln, die zu vorzeitiger Differenzierung führen würden. Im Erwachsenenalter wird die DIO3 hauptsächlich im Gehirn und in der Plazenta exprimiert (Sabatino et al., 2021). Aktivität und Expression der Isoformen werden durch die intrazellulären T_3 - und T_4 -Spiegel reguliert. Während die Aktivität der DIO1 und DIO3 hauptsächlich durch Veränderungen der Genexpression gesteuert wird, spielt dieser Mechanismus für die Regulation der DIO2 eine untergeordnete Rolle (Bianco et al., 2002). Die Aktivität der DIO2 wird primär durch den intrazellulären T_4 -Spiegel beeinflusst. Die Bindung des Substrates an die DIO2 fördert die Ubiquitinierung und Degradation des Enzyms, was zu einer Verringerung der DIO2-Aktivität führt (Bianco et al., 2002; Wagner et al., 2007).

1.3 Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse

Die bedarfsgerechte Versorgung des menschlichen Organismus mit Schilddrüsenhormonen wird durch das Zusammenspiel von Hypothalamus, Hypophyse und Schilddrüse sichergestellt. Die Schilddrüse als Ort der Hormonsynthese wird durch die übergeordneten Organe Hypophyse und Hypothalamus stimuliert und reguliert. Thyreoliberin (TRH, *thyrotropin releasing hormone*) wird in den Neuronen des Nucleus paraventricularis des Hypothalamus synthetisiert und freigesetzt (Carlson & Hershman, 1975). Durch Bindung an den TRH-Rezeptor stimuliert das Hormon die Bildung von Thyreotropin (TSH, Thyroidea-stimulierendes Hormon) in thyreotropen Zellen der Adenohypophyse. TSH wird ins Blut freigesetzt und gelangt so zur Schilddrüse, wo es durch Bindung an den TSH-Rezeptor die Bildung von T_3 und T_4 anregt (Carlson & Hershman, 1975). Aus der Schilddrüse freigesetzte Hormone erhöhen die Serum-Spiegel von T_3 und T_4 , was wiederum durch einen negativen Feedbackmechanismus zur Inhibition der TRH- und TSH-Sekretion führt (Ortiga-Carvalho et al., 2016). Störungen der thyreotropen Achse auf den verschiedenen Ebenen können zur Manifestation des Krankheitsbildes einer Hyper- bzw. Hypothyreose führen.

1.4 Die Rolle von Schilddrüsenhormonen in prä- und postnataler Entwicklung

Störungen der Schilddrüsenhormonhomöostase gehören zu den häufigsten endokrinologischen Erkrankungen im Erwachsenenalter (Madariaga et al., 2014). Eine manifeste Hypothyreose mit erniedrigtem Serum T_3 und T_4 führt typischerweise zu Symptomen wie Gewichtszunahme, Müdigkeit, Kälteintoleranz und psychischen Veränderungen wie Depressionen (Hintze & Derwahl, 2010). Die Symptome einer Hyperthyreose äußern sich gegensätzlich mit Gewichtsverlust, vermehrtem Schwitzen, Nervosität und Unruhe (Johnson & Felicetta, 1992). Im Erwachsenenalter sind die Symptome einer Schilddrüsenerkrankung unter einer wirksamen Therapie in der Regel vollständig reversibel. Im Gegensatz dazu kann eine angeborene Unterversorgung mit Schilddrüsenhormonen während der prä- und postnatalen Entwicklung, zu einer dauerhaften Schädigung des Kindes führen (Wassner, 2017). Die Entwicklung der Schilddrüse im Rahmen der Embryogenese beginnt in der dritten Schwangerschaftswoche und setzt sich bis zur 10. Schwangerschaftswoche fort. Ab der 16. Schwangerschaftswoche beginnt das Organ Hormone in den Blutkreislauf des Feten zu sezernieren (Bernal, 2000; Howdeshell, 2002). Die

Entwicklung des menschlichen Gehirns beginnt bereits in der zweiten Schwangerschaftswoche mit der Bildung des Neuralrohrs und setzt sich weit über die Geburt hinaus fort (Rice & Barone, 2000). Zum Zeitpunkt der beginnenden neurologischen Entwicklung wird das Kind noch durch T_4 aus dem Blutkreislauf der Mutter versorgt (Bernal, 2000). Kinder von Müttern, deren Serum T_4 -Spiegel - insbesondere in der Frühschwangerschaft - erniedrigt war, werden mit einem niedrigerem IQ geboren und zeigen Defizite in der psychomotorischen Entwicklung (Haddow et al., 1999; Pop et al., 1999). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von Schilddrüsenhormonen für viele komplexe Vorgänge im Rahmen der Neurogenese essentiell ist. So führt ein Mangel an Schilddrüsenhormonen während der Frühschwangerschaft zu Störungen der neuralen Migration und Differenzierung (Ausó et al., 2004), der Reifung von Interneuronen (Gilbert et al., 2007; Richard et al., 2023) und einer verzögerten Myelinisierung von Neuronen (Bernal, 2000). Eine mangelnde Schilddrüsenhormonproduktion durch das Kind zum Zeitpunkt der Geburt, kann sich als Kretinismus manifestieren und unbehandelt zu irreversiblen Hirnschäden und mentaler Retardierung führen (Wassner, 2017). Aus diesem Grund ist die Bestimmung des Thyreotropin-Spiegels (TSH) zur Detektion der kongenitalen Hypothyreose seit den 1970er-Jahren Bestandteil des Neugeborenen Screenings in Deutschland (Ford & Laffranchi, 2014)

1.5 MCT8-Defizienz

1944 wurde durch William Allan, Nash Herndon und Florence Dudley eine vererbte Krankheit beschrieben, die mit geistiger Retardierung, Muskelschwäche und Entwicklungsverzögerung einhergeht (Allan et al., 1944). Mehr als ein halbes Jahrhundert später konnten Mutationen im Gen *SLC16A2* als Ursache der Erkrankung identifiziert werden (Dumitrescu et al., 2004; Friesema et al., 2004; Holden et al., 2005). *SLC16A2* ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und kodiert für den Schilddrüsenhormontransporter MCT8. MCT8-Defizienz, früher als Allan-Herndon-Dudley-Syndrom bezeichnet, betrifft männliche Patienten mit einer geschätzten Prävalenz von 1:70.000 (Groeneweg et al., 2020). Mutationen in *SLC16A2* führen zum Verlust bzw. zur Einschränkung der Transportfunktion von MCT8 für Schilddrüsenhormone. Aufgrund der gewebsspezifischen Expression von MCT8 und anderer Schilddrüsenhormontransporter, variiert die Bedeutung von MCT8 für die Aufnahme von T_3 und T_4 je nach Organ. Während einige Gewebe eine Vielzahl von

Transportern exprimieren, ist in anderen die Hormonaufnahme überwiegend von MCT8 abhängig (Groeneweg, Van Geest, et al., 2019). Dadurch ist die Aufnahme von Schilddrüsenhormonen in verschiedene Organe unterschiedlich stark beeinträchtigt. Als besonders wichtig hat sich MCT8 für die Funktion und Entwicklung des menschlichen Gehirns erwiesen. Patienten mit MCT8-Defizienz zeigen deutliche Anzeichen für eine cerebrale Hypothyreose (Groeneweg et al., 2020). Das klinische Bild der Erkrankung wird vor allem durch schwere neurologische Entwicklungsstörungen bei den betroffenen Kindern geprägt. Typisch ist eine ausgeprägte muskuläre Hypotonie im ersten Lebensjahr, die zu einer unzureichenden Kopfkontrolle führt, sowie eine schwere geistige Retardierung. Nur wenige Kinder erlangen im Laufe ihres Lebens die Fähigkeit zu sprechen, frei zu sitzen oder einige Schritte zu gehen (Groeneweg, Van Geest, et al., 2019). Die neurologische Entwicklungsstörung zeigt sich magnetresonanztomographisch (MR-tomographisch) in einer verzögerten Myelinisierung, weshalb bei Patienten oft zunächst die Pelizäus-Merzbacher Erkrankung vermutet wird (Groeneweg et al., 2020). Häufig entwickeln erkrankte Kinder eine Dysphagie, die mit Untergewicht durch Mangelernährung und Aspiration von Nahrungsbestandteilen einhergehen kann (Groeneweg et al., 2020). Neben dem neurologischen Phänotyp sind charakteristische Serumhormonspiegel mit erhöhtem T_3 , leicht erniedrigtem T_4 und normwertigem bis leicht erhöhtem TSH typisch für das Krankheitsbild. Durch die Expression weiterer Schilddrüsenhormontransporter kommt es in peripheren Organen wie Leber und Muskel trotz eingeschränkter oder fehlender Funktion von MCT8, nicht zu einer Reduktion der Schilddrüsenhormonaufnahme. Durch die erhöhten Serum- T_3 -Spiegel befinden sich diese Organe sogar in einem hyperthyreoten Zustand (Groeneweg et al., 2020). Bedingt durch die periphere Hyperthyreose sind die Patienten häufig tachykard, zeigen erhöhte systolische Blutdruckwerte und Herzrhythmusstörungen wie atriale und ventrikuläre Extrasystolen (Groeneweg et al., 2020). Der Einfluss der erhöhten Serum- T_3 -Spiegel auf die Leber äußert sich typischerweise in einer Erhöhung der Serumspiegel von Sexualhormon-bindenden Globulin (SHGB), und der Leberenzyme Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST) und Gamma-Glutamyltransferase (GGT). Serum-Kreatinin und Kreatininkinase als Marker für die Funktion von Nieren bzw. Muskelgewebe befinden sich typischerweise im unteren Referenzbereich (Groeneweg et al., 2020). Die Lebenserwartung von Patienten mit MCT8-Defizienz ist mit einer mittleren Überlebenszeit von 35 Jahren deutlich reduziert. Zu den häufigsten

Todesursachen zählen pulmonale Infektionen, plötzlicher Herztod und Aspirationspneumonie. Als prognostisch günstig gilt das Erlangen der vollständigen Kontrolle des Kopfes, während Untergewicht mit einer erhöhten Sterblichkeit korreliert (Groeneweg et al., 2023).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden bereits über 100 verschiedene Mutationen in *SLC16A2* identifiziert. Mutationen in *SLC16A2* verursachen im Wesentlichen über zwei Mechanismen einen Verlust bzw. eine Reduktion der Transportfähigkeit von MCT8. Insbesondere Mutationen, die das aktive Zentrum des Transporters betreffen, können die Substratbindung beeinträchtigen und damit zu einem vollständigen Funktionsverlust von MCT8 führen. Daneben wurde eine Gruppe von Mutationen (z.B. ins235V, R271H und L568P) identifiziert, die zur Expression instabiler MCT8-Varianten führen. In diesem Fall ist die Freisetzung von MCT8 aus dem ER und der Transport des Moleküls zur Plasmamembran eingeschränkt, die Proteine besitzen jedoch häufig noch eine Restaktivität für den Transport von T₃ und T₄ (Kinne et al., 2009). In der Vergangenheit konnte mehrfach gezeigt werden, dass Expression und Stabilität pathogener MCT8-Varianten vom zellulären Kontext abhängen und je nach Zelltyp variieren (Kerseboom et al., 2013; Kinne et al., 2009). Eine definitive Korrelation zwischen Subtyp der Mutation und Phänotyp des Patienten konnte bisher noch nicht hergestellt werden. Es hat sich jedoch gezeigt, dass Mutationen mit residualer Transportaktivität *in vitro*, häufig mit einem milderem Phänotyp einhergehen. Betroffene Patienten zeigen eine geringere Ausprägung der psychomotorischen Defizite, erlangen die Fähigkeit, wenige Schritte zu gehen, und können gegebenenfalls einige Worte sprechen (Friesema et al., 2010; Jansen et al., 2008)

1.5.1 MCT8^{P321L}

Die Punktmutation von Prolin zu Leucin an Position 321 (P321L), die Gegenstand dieser Arbeit ist, wurde erstmals in Zwillingsgeschwistern mit schwerer Ausprägung der MCT8-Defizienz beschrieben (Vaurs-Barrière et al., 2009; Verge et al., 2012). Die Brüder sind Kinder einer heterozygoten, gesunden Mutter. Im Alter von vier Monaten wurden die Zwillinge auf Grund der fehlenden Fähigkeit zum Augenkontakt und sozialem Lächeln medizinisch vorgestellt. Im Alter von 10 Monaten konnten die Jungen weder frei sitzen, noch ihren Kopf kontrollieren und zeigten dystone Bewegungsstörungen von oberer und unterer Extremität. MR-tomographisch ließ sich eine verzögerte Myelinisierung nachweisen.

Laborchemisch war das Serum-T₃ erhöht, bei gleichzeitig erniedrigtem T₄-Spiegel und normwertigem TSH. Mit 6 Monaten zeigten die Zwillinge eine verzögerte Gewichtszunahme mit einem Körpergewicht unterhalb der 1. Perzentile (Verge et al., 2012). Die Mutation P321L wurde bereits in verschiedenen überexprimierenden Zellmodellen untersucht und zeigte dort einen vollständigen Verlust der Transportfunktion für Schilddrüsenhormone (Kersseboom et al., 2013). Während die Expression von MCT8^{P321L} in COS-1, JEG-3, and Flp-in-293 Zellen erhalten ist, ließ sich in *Madine-Darby Canine Kidney* Zellen (MDCK1) und *iPS derived brain microvascular endothelial-like cells* (iBMECs) eine reduzierte Expression des pathogenen Transporters nachweisen (Braun et al., 2022; Kersseboom et al., 2013). Dadurch wird die Relevanz des zellulären Kontexts für die Expression und Funktion von MCT8 verdeutlicht. Der Vergleich von MCT8^{P321L} mit orthologen MCT8-Molekülen und anderen Transportern aus der MCT-Familie, deutet auf eine hohe Konservierung der Aminosäure P321 hin (Valcárcel-Hernández et al., 2022). In *silico* Proteinstrukturvorhersageanalysen der pathogenen Variante MCT8^{P321L} legen nahe, dass die Mutation keinen direkten Einfluss auf die Substratbindungsstelle von MCT8 hat, jedoch zu einem veränderten Abstand zwischen den Transmembranhelices des Proteins führt und dadurch dessen gesamte Struktur verändert. Nach dieser Vorhersage wäre die Bindungsstelle von MCT8^{P321L} für Schilddrüsenhormone nicht mehr zu erreichen (Valcárcel-Hernández et al., 2022).

1.6 Mausmodelle

Die im Folgenden beschriebenen Mausmodelle sind vergleichend in Tabelle 1 dargestellt.

1.6.1 *Mct8ko*

Um die Auswirkungen der MCT8-Defizienz zu untersuchen und mögliche Therapieansätze zu erproben, wurden in den letzten Jahren verschiedene Mausmodelle etabliert. Dabei zeigte sich, dass der komplette knock-out von MCT8 in Mäusen (*Mct8ko*) die Symptome von Patienten mit MCT8-Defizienz nur teilweise abbilden kann. *Mct8ko*-Mäuse stellen zwar ein gutes Modell für die typischen Veränderungen der Serum-Hormonspiegel mit erhöhtem T₃ und erniedrigtem T₄ dar (Trajkovic et al., 2007), zeigen jedoch keine offensichtlichen neurologischen Einschränkungen. Bei der Charakterisierung der *Mct8ko*-Maus konnte gezeigt werden, dass die zelluläre Aufnahme von T₃ und T₄ aus dem Blut -

abhängig vom untersuchten Organ - gar nicht bis stark beeinträchtigt ist. Neben MCT8 kann die Aufnahme von Schilddrüsenhormonen durch eine Reihe weiterer Transportproteine, darunter MCT10, OATP1C1, LAT1 (L-type amino acid transporter 1) und LAT2 erfolgen, deren Expression abhängig von Organ und Entwicklungszeitpunkt stark variiert (Groeneweg, Van Geest, et al., 2019; Jansen et al., 2005). Die Aufnahme von T₃ und T₄ aus dem Blut in Leber- und Nierengewebe ist in *Mct8ko*-Mäusen gegenüber dem Wildtyp nicht beeinträchtigt und erfolgt entsprechend der herrschenden Serumspiegel (Dumitrescu et al., 2006; Trajkovic et al., 2007). Durch die erhöhten T₃-Spiegel im Blut befinden sich Leber und Niere von *Mct8ko*-Mäusen demnach in einem hyperthyreoten bis thyreotoxischen Zustand. Neben einem direkt messbaren, erhöhten T₃-Gehalt in den Organen, lässt sich die hyperthyreote Stoffwechsellage anhand einer veränderten Expression T₃-regulierter Gene wie *Glutathion-S-Transferase α2 (Gsta2)* und *Dio1* nachweisen (Dumitrescu et al., 2006; Trajkovic et al., 2007). In Nierengewebe konnte zudem eine Akkumulation von T₃ und T₄ aus dem Blut beobachtet werden, deren Ursache noch nicht abschließend geklärt ist (Trajkovic-Arsic et al., 2010). Auf Grund der schweren neurologischen Symptome, die das Krankheitsbild der MCT8-Defizienz prägen, sind Aufnahme und Metabolismus von Schilddrüsenhormonen im Gehirn von *Mct8ko*-Mäusen von besonderem Interesse. *Mct8ko*-Mäuse zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich reduzierte cerebrale Aufnahme von T₃, während die Aufnahme von T₄ nur gering beeinträchtigt ist (Trajkovic et al., 2007). Sowohl der T₃-, als auch der T₄-Gehalt von Großhirngewebe ist in *Mct8ko*-Mäusen gegenüber dem Wildtyp reduziert. Reduzierte T₃-Spiegel führen durch Regulation der Genexpression zu einer erhöhten Aktivität der DIO2 und einer reduzierten Aktivität der DIO3 in Hirngewebe von *Mct8ko*-Mäusen (Mayerl et al., 2014; Trajkovic et al., 2007). Die genauere Untersuchung von Gewebe aus dem cerebralen Cortex von *Mct8ko*-Mäusen, zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine Reduktion des T₃-, nicht aber des T₄-Gehalts (Valcárcel-Hernández et al., 2022). Trotz der stark beeinträchtigten cerebralen T₃-Aufnahme, zeigen die Tiere keinerlei neurologische Auffälligkeiten. Auch molekulargenetisch und histologisch ließen sich lediglich milde Veränderungen nachweisen, die auf einen leicht hypothyreoten Zustand des Gehirns hinweisen (Mayerl et al., 2014; Trajkovic et al., 2007). Nach aktuellem Forschungsstand scheint die erhaltene Aufnahme von T₄, in Kombination mit einer verstärkten Umwandlung von T₄ zu T₃ durch die DIO2 ausreichend zu sein, um eine weitestgehend normale Differenzierung neuronaler Strukturen zu

ermöglichen. Die erhaltene cerebrale Aufnahme von T₄ in *Mct8*ko-Mäusen, wird im Wesentlichen auf die Expression von OATP1C1 (SLCO1C1) in der Blut-Hirn-Schranke der Tiere zurückgeführt (Mayerl et al., 2014). OATP1C1 transportiert T₄ mit deutlich höherer Affinität als T₃ und zeigt eine starke Expression in der Blut-Hirn-Schranke von Mäusen während der frühen Gehirnentwicklung. Im Kapillarsystem des menschlichen Gehirns konnte der Transporter in vergleichbaren Entwicklungsstadien nicht nachgewiesen werden (Roberts et al., 2008). Im Vergleich zum Wildtyp ist die Expression von OATP1C1 in Cortextgewebe von *Mct8*ko-Mäusen erhöht und der T₄-Gehalt im Cortex der Tiere nicht reduziert (Valcárcel-Hernández et al., 2022). Damit liefert OATP1C1 einen möglichen Erklärungsansatz für den fehlenden neurologischen Phänotyp von *Mct8*ko-Mäusen. Auf der Suche nach einem Mausmodell, das auch die neurologischen Beeinträchtigungen der MCT8-Defizienz abbildet, wurden auf Grundlage dieser Hypothese zwei weitere Mausmodelle etabliert: *Mct8/Oatp1c1*dko und *Mct8/Dio2*dko.

1.6.2 *Mct8/Oatp1c1*dko

Wie das *Mct8*ko-Mausmodell, bilden auch *Mct8/Oatp1c1*dko-Mäuse die krankheitstypischen Veränderungen des peripheren Schilddrüsenhormonstatus mit erhöhtem Serum-T₃ und erniedrigtem T₄-Spiegel ab. Anders als *Mct8*ko-Mäuse lassen sich *Mct8/Oatp1c1*dko-Mäuse bereits phänotypisch durch eine Reduktion von Gewicht und Körpergröße vom Wildtyp unterscheiden. Darüber hinaus zeigen die Tiere neurologische Auffälligkeiten mit Einschränkungen von Motorik, Koordination und Griffkraft (Mayerl et al., 2014). Transportmessungen konnten eine reduzierte cerebrale Aufnahme von T₃ und T₄ nachweisen (Mayerl et al., 2014). Anders als in *Mct8*ko-Mäusen, die eine starke Reduktion des T₃-Transports bei erhaltener Aufnahme von T₄ zeigen, schränkt die Inaktivierung von OATP1C1 in *Mct8/Oatp1c1*dko-Mäusen also auch die Aufnahme von T₄ in das Gehirn der Tiere ein. Reduzierte cerebrale T₃- und T₄-Spiegel, sowie eine signifikant veränderte Expression der T₃ regulierten Gene *Hairless (Hr)*, *Neurogranin (RC3)* und *Aldehydehydrogenase 1a1 (Aldh1h1)*, bestätigen den hypothyreoten Zustand im Gehirn von *Mct8/Oatp1c1*dko-Mäusen (Mayerl et al., 2014). Auch histologisch ließen sich Veränderungen des Gehirns nachweisen, die einen Mangel an Schilddrüsenhormonen nahelegen. *Mct8/Oatp1c1*dko-Mäuse zeigen eine verzögerte Differenzierung von Purkinje-Zellen im Kleinhirn, eine reduzierte Myelinisierung kortikaler Axone und eine Reduktion GABAerger

Interneurone im somatosensorischen Kortex (Mayerl et al., 2014). Neben T₄ katalysiert OATP1C1 den Transport weiterer Substrate, unter anderem Metabolite von Steroidhormonen (Westholm et al., 2009). Da ein Einfluss durch den gestörten Transport dieser Substrate auf den neurologischen Phänotyp von *Mct8/Oatp1c1*dko-Mäusen nicht ausgeschlossen werden kann, wurde mit der *Mct8/Dio2*dko-Maus ein weiteres Modell zur Untersuchung von neurologischen Veränderungen im Rahmen der MCT8-Defizienz etabliert.

1.6.3 *Mct8/Dio2*dko

Wie die zuvor beschriebenen Mausmodelle weisen auch *Mct8/Dio2*dko-Mäuse die für MCT8-Defizienz typischen Veränderungen der Serumhormonspiegel auf (Bárez-López et al., 2019; Liao et al., 2011). Periphere Organe wie Skelettmuskulatur und Lebergewebe befinden sich durch die erhöhten Serum-T₃-Spiegel in einer hyperthyreoten Stoffwechsellage (Bárez-López et al., 2019; Liao et al., 2011). Wie in *Mct8*ko-Mäusen bereits gezeigt, konnte auch in Cortexgewebe von *Mct8/Dio2*dko-Mäusen eine Reduktion des T₃-Gehalts nachgewiesen werden. Der Gehalt von T₄ im cerebralen Cortex der Tiere ist nicht reduziert (Bárez-López et al., 2019). Die Aufnahme von T₄ ins Gehirn von *Mct8/Dio2*dko-Mäusen ist zwar wie in *Mct8*ko-Mäusen nicht beeinträchtigt, die zusätzliche Inaktivierung der DIO2 verhindert jedoch die Umwandlung von T₄ in das biologisch aktive T₃ (Bárez-López et al., 2019). Phänotypisch zeigen die Tiere neurologische Auffälligkeiten mit Störungen der Motorik, einem veränderten Gangbild und einer Reduktion der Muskelkraft. Immunhistochemisch lässt sich eine Reduktion der Expression von *Parvalbumin (Pvalb)* und *Neurofilament H (neurofilament heavy polypeptide, Nefh)* in motorischem und somatosensorischem Cortex und den Basalganglien nachweisen, die auf eine Veränderung im Bereich GABAerger Interneurone und eine gestörte neuronale Reifung hindeutet (Bárez-López et al., 2019). Damit liefern *Mct8/Dio2*dko-Mäuse ein weiteres Modell für die Auswirkungen der MCT8-Defizienz auf neuronales Gewebe.

1.6.4 MCT8^{P253L}

Die murine Punktmutation P253L entspricht der humanen Mutation P321L. Das MCT8^{P253L}-Mausmodell bietet die Möglichkeit die Auswirkungen der Punktmutation P253L in einem komplexen Organismus zu untersuchen. Wie in zuvor beschriebenen Mausmodellen, ließen sich auch in MCT8^{P253L}-Mäusen erhöhte Serum-T₃-Spiegel, bei gleichzeitig

reduziertem T_4 und ein erhöhter T_3 -Gehalt in Lebergewebe nachweisen (Valcárcel-Hernández et al., 2022). Der Vergleich der $MCT8^{P253L}$ -Maus mit dem *Mct8ko*-Mausmodell liefert insbesondere im Hinblick auf den neurologischen Phänotyp interessante Ergebnisse. Die Untersuchung von Cortexgewebe aus $MCT8^{P253L}$ -Mäusen ergab eine Reduktion sowohl des T_3 -, als auch des T_4 -Gehalts, während in *Mct8ko*-Mäusen lediglich der T_3 -Spiegel erniedrigt ist (Valcárcel-Hernández et al., 2022). Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise auf eine fehlende Kompensation durch die Transporter OATP1C1 und LAT1 zurückführen, deren Expression in *Mct8ko*-Mäusen im Vergleich zu $MCT8^{P253L}$ -Mäusen erhöht ist. Überraschenderweise zeigt Cortexgewebe von $MCT8^{P253L}$ -Mäusen trotz der gestörten T_4 -Aufnahme keine signifikante Veränderung der Expression T_3 regulierter Gene (Valcárcel-Hernández et al., 2022). Dennoch ließen sich immunhistochemisch Veränderungen nachweisen, die einen hypothyreoten Zustand des Gehirns von $MCT8^{P253L}$ -Mäusen nahelegen. Die Tiere zeigen eine veränderte Neuroarchitektur im cerebralen Cortex, eine reduzierte Anzahl Parvalbumin-, Calbindin- und Gad65/67-positiver Zellen und eine Zunahme Calretinin-positiver Neurone (Valcárcel-Hernández et al., 2022). Während *Mct8ko*-Mäuse kaum neurologische Auffälligkeiten präsentieren, konnte in $MCT8^{P253L}$ -Mäusen eine verringerte Muskelkraft, reduzierte Koordination und Balance und ein ängstlicheres Verhalten beobachtet werden (Valcárcel-Hernández et al., 2022; Wirth et al., 2009).

Tab. 1: Vergleichende Darstellung der Mausmodelle

	Serum	Gehirn	Leber	Niere
<i>Mct8ko</i>	T ₃ ↑, T ₄ ↓, TSH ↑	T ₃ ↓, T ₄ ↓ T ₃ -Aufnahme: ↓↓ T ₄ -Aufnahme: ↓ DIO2: ↑ DIO3: ↓	T ₃ ↑, T ₄ ↓ T ₃ -Aufnahme: ↔ T ₄ -Aufnahme: ↔ DIO1: ↑	T ₃ ↑, T ₄ ↑ T ₃ -Aufnahme: ↑ T ₄ -Aufnahme: ↑ DIO1: ↑
	Weitere Beobachtungen: Griffkraft & Motorik ↔, Gewicht, Körpergröße ↔			
<i>Mct8/Oatp1c1dko</i>	T ₃ ↑, T ₄ ↓, TSH ↑	T ₃ ↓↓, T ₄ ↓↓ T ₃ -Aufnahme: ↓↓ T ₄ -Aufnahme: ↓↓ DIO1: ↑↑ DIO3: ↓↓	T ₄ -Aufnahme: ↔ DIO1: ↑	T ₄ -Aufnahme: ↑ DIO1: ↑↑
	Weitere Beobachtungen: Motorik, Koordination & Griffkraft ↓ Gewicht, Körpergröße ↓			
<i>Mct8/Dio2dko</i>	T ₃ ↑, T ₄ ↓, TSH ↑	T ₃ ↓, T ₄ ↔ DIO3: ↓	T ₃ ↑, T ₄ ↔ DIO1: ↑	n.d.
	Weitere Beobachtungen: Motorik, Gangbild & Griffkraft ↓ Gewicht ↓			
<i>MCT8^{P253L}</i>	T ₃ ↑, T ₄ ↓	T ₃ ↓, T ₄ ↓ DIO3: ↔	T ₃ ↑, T ₄ ↓	n.d.
	Weitere Beobachtungen: Muskelkraft, Koordination & Balance ↓			

1.7 Behandlungsansätze

Die Suche nach möglichen Therapien der seltenen, aber schwerwiegenden Erkrankung MCT8-Defizienz umfasst verschiedene Behandlungsansätze. Eine optimale Therapie sollte die Symptome der peripheren Hyperthyreose mildern und gleichzeitig einen euthyreoten Zustand im Gehirn herstellen, um dadurch eine normale neurologische Entwicklung zu ermöglichen. In ersten Therapieansätzen wurde versucht die veränderte Schilddrüsenhormonkonstellation durch Hormonersatztherapie mit Levothyroxin (LT₄) allein, oder in Kombination mit T₃ wiederherzustellen. Dadurch konnte zwar das TSH erniedrigt und der Serum-T₄-Spiegel normalisiert werden, allerdings führte die Behandlung zu einer

weiteren Erhöhung der T₃-Spiegel, wodurch die Symptome der peripheren Hyperthyreose verstärkt wurden. Auf die neurologischen Symptome zeigte die Behandlung keinen Effekt (Namba et al., 2008; Papadimitriou et al., 2008). In der Hoffnung, die erhöhten Serum-T₃-Spiegel reduzieren zu können, wurden klassische Thyreostatika eingesetzt. Die Behandlung mit Thiamazol war ineffektiv und führte zu keiner Veränderung der Schilddrüsenparameter (Visser et al., 2013). Der Einsatz von Propylthiouracil (PTU), einem Inhibitor der DIO1, in Kombination mit LT₄ führte zwar zu einer Normalisierung der Schilddrüsenhormonwerte (Visser et al., 2013), auf Grund der Hepatotoxizität des Medikamentes ist der Einsatz insbesondere zur Behandlung von Kindern allerdings kritisch zu bewerten (Rivkees & Mattison, 2009).

1.7.1 Thyreomimetische Substanzen

In den letzten Jahren wurde insbesondere die Forschung zum Einsatz thyreomimetischer Substanzen in der Therapie der MCT8-Defizienz intensiv verfolgt. 3,5-Dijodpropionsäure (DIPTA) ist ein Hormonanalogen, das mit deutlich geringerer Affinität an den Schilddrüsenhormonrezeptor bindet als T₃. Die verzögerte Myelinisierung in MCT8-defizienten Zebrafischen konnte durch die Behandlung mit DIPTA normalisiert werden (Zada et al., 2016). In der Behandlung von MCT8-defizienten Mäusen führte der Einsatz von DIPTA zu einer Normalisierung der T₃ und TSH-Spiegel, es kam allerdings auch zu einer weiteren Reduktion des bereits erniedrigten T₄ (Di Cosmo et al., 2009; Ferrara et al., 2014). Der Einsatz der Substanz in vier Patienten, konnte die Plasma-Schilddrüsenhormonwerte inklusive T₄ normalisieren, hatte aber keine positiven Effekte auf die neurologische Entwicklung der Kinder (Grijota-Martínez et al., 2020).

3,3',5-Trijodthyreoessigsäure (TRIAC) ist ein natürlicher Metabolit von Schilddrüsenhormonen und besitzt eine hohe Affinität zu den beiden Isoformen des humanen Schilddrüsenhormonrezeptors (Messier & Langlois, 2000). Die zelluläre Aufnahme der Substanz erfolgt unabhängig von MCT8 durch SLC22A9 und SLC29A2 (Kerseboom et al., 2014). Im *Mct8/Oatp1c1dko*-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit TRIAC die neuronale Differenzierung im cerebralen und cerebellären Cortex fördert, die Myelinisierung von Neuronen verbessert, Reifung und Funktion des GABAergen-Systems wiederherstellt und die motorischen Fähigkeiten der Tiere normalisiert (Chen et al., 2023; Kerseboom et al., 2014). Der volle Effekt der Therapie konnte allerdings nur erzielt

werden, wenn die Behandlung unmittelbar postnatal etabliert wurde (Chen et al., 2023). Damit erfüllt TRIAC wesentliche Bedingungen, um als effektives Mittel zur Behandlung der MCT8-Defizienz in Frage zu kommen. Der klinische Effekt von TRIAC wurde von Groeneweg und Kollegen in einer Phase-II klinischen Studie an 46 pädiatrischen und adulten Patienten mit MCT8-Defizienz untersucht. Die Behandlung mit TRIAC über 12 Monate führte zu einer deutlichen Reduktion der Serum-T₃-Spiegel (Groeneweg, Peeters, et al., 2019). Anhand einer Verbesserung des altersbezogenen Gewichts und einer Reduktion von Ruheherzfrequenz und systolischem Blutdruck, konnte die positive Wirkung von TRIAC auf die Symptome der peripheren Hyperthyreose nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten Leber- und Nierenfunktion durch die Behandlung verbessert werden, messbar anhand einer Reduktion der Serum-SHGB-Konzentration bzw. Zunahme der Kreatininkonzentration (Groeneweg, Peeters, et al., 2019). Eine weitere Phase-II klinische Studie, mit Fokus auf den Einfluss von TRIAC auf die neurologische Entwicklung von Säuglingen und Kleinkindern mit MCT8-Defizienz befindet sich aktuell in der Durchführung ([NCT02396459](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02396459)).

1.7.2 Gentherapie

Ansätze zur Behandlung von MCT8-Defizienz durch Gentherapie sind Gegenstand aktueller Forschung. Cerebrale MCT8-Expression und T₃-Aufnahme in *Mct8*ko-Mäusen konnten durch Injektion von MCT8-exprimierendem Adenoassoziiertem Virus 9 (AAV-9) wiederhergestellt werden (Iwayama et al., 2016). Die selektive Transduktion cerebraler Endothelzellen durch AAV-BR1-*Mct8* konnte den T₃-Spiegel im Gehirn von *Mct8/Oatp1c1*dko-Mäusen wiederherstellen und die neurologischen Symptome der Versuchstiere verbessern (Sundaram et al., 2022). Damit stellt die Gentherapie analog zur spinalen Muskelatrophie (SMA) einen vielversprechenden Behandlungsansatz dar, bis zu dessen klinischer Anwendung allerdings noch Jahre vergehen werden.

1.7.3 NaPB in der Therapie der MCT8-Defizienz

Gegenstand dieser Arbeit ist die Erprobung des chemischen Chaperons Natriumphenylobutyrat (NaPB) im Mausmodell. Nachdem verschiedene Mutationen in *SCL16A2* identifiziert wurden, die zu einer verminderten Proteinstabilität führen, gewann die Forschung zum Einsatz von chemischen Chaperonen als Therapieoption der MCT8-Defizienz an

Relevanz. NaPB ist bereits seit Jahren als Medikament zur Therapie von Harnstoffzyklusdefekten zugelassen und die Anwendung der Substanz zur Behandlung weiterer Erkrankungen wie Hämoglobinopathien, Krebserkrankungen und Motoneuronerkrankungen ist Gegenstand klinischer Studien (Iannitti & Palmieri, 2011). Daher sind Daten zu Dosisfindung und Nebenwirkungen von NaPB leicht zugänglich und eine experimentelle Anwendung des Medikaments zur Behandlung der MCT8-Defizienz vergleichsweise leicht möglich. Neben seiner Funktion als Ammoniak-Fänger, die zur Therapie von Harnstoffzyklusdefekten genutzt wird, wirkt NaPB als chemisches Chaperon.

1.7.3.1 Wirkmechanismus endogener und chemischer Chaperone

Die dreidimensionale Struktur eines Proteins entsteht bereits während der Translation durch Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten von Aminosäuren und ist für die korrekte Funktion des Moleküls essentiell. Das komplexe Zusammenspiel von Proteintranslation, -faltung und -abbau wird als Proteostase bezeichnet. Für sekretorische Proteine und Transmembranproteine wie MCT8 finden diese Vorgänge am ER statt (Hetz, 2012). Wichtiger Bestandteil der intrazellulären Proteindegradation ist das Ubiquitin-Proteasom System (UPS). Proteine die für den Abbau bestimmt sind, werden durch Ubiquitin markiert und können so durch das Proteasom erkannt und lysiert werden (Nandi et al., 2006). Störungen der Proteostase führen nachweislich zur Manifestation oder zum Progress zahlreicher Krankheiten, darunter neurodegenerative Erkrankungen wie Demenz, Diabetes Mellitus Typ II, Amyloidose und cystische Fibrose (Hartl et al., 2011). Endogene Chaperone sind Proteine, die natürlicherweise in Zellen vorkommen und die korrekte Faltung von Proteinen durch Interaktion mit hydrophoben Molekülanteilen unterstützen (Hartl et al., 2011). Proteine dieser Gruppe werden unter Stressbedingungen vermehrt exprimiert und auf Grund dieser Eigenschaft auch als HSPs (*heat-shock proteins*) bezeichnet. Eine Einteilung in Gruppen erfolgt nach Molekulargewicht in HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100 und kleine HSPs (Hartl et al., 2011). Die Lektinchaperone Calnexin und Calreticulin unterstützen insbesondere die korrekte Faltung von Glykoproteinen (Paskevicius et al., 2023). Auf Grund von pathogenen Genvarianten veränderte Aminosäuresequenzen können die korrekte Faltung von Proteinen beeinträchtigen und zur Aggregation und Akkumulation der fehlerhaften Moleküle in der Zelle führen. Eine überschießende Akkumulation fehlerhafter Proteine im ER löst ein zelluläres Schutzprogramm aus, das als UPR

(*unfolded protein response*) bezeichnet wird und die Wiederherstellung der ER-Funktion gewährleisten soll (Hetz, 2012). Chemische Chaperone wie NaPB können durch unspezifische Wechselwirkungen die Löslichkeit fehlgefalteter Proteine verbessern und durch Abschirmung hydrophober Bereiche eine Aggregation verhindern (Iannitti & Palmieri, 2011). Auf Grundlage dieser Funktion wurde NaPB bereits zur Behandlung von zystischer Fibrose erfolgreich eingesetzt (Rubenstein & Zeitlin, 1998; Zeitlin et al., 2002). Pathophysiologische Ursache dieser Erkrankung ist in den meisten Fällen die Mutation $\Delta F508$ im Gen für den Anionenkanal *cystic fibrosis transmembrane regulator* (CFTR). Die veränderte Aminosäuresequenz erschwert den Einbau des Kanals in die Zellmembran und führt zu einer erhöhten intrazellulären Degradation des Proteins (Brown et al., 1996). Durch Behandlung mit NaPB als chemisches Chaperon konnte der Einbau von CFTR in die Plasmamembran verbessert und dadurch eine erhöhte Chlorid-Passage über die Zellmembran erreicht werden (Rubenstein et al., 1997). Mittlerweile wurden speziell auf diese Erkrankung angepasste pharmakologische Chaperone - sogenannte CFTR-Modulatoren - zur Behandlung der zystischen Fibrose zugelassen (Trikafta for Cystic Fibrosis, 2020). Auf Grundlage des aktuellen Forschungsstandes im Bereich der MCT8-Defizienz, wäre ein ähnlicher Wirkmechanismus von NaPB auf ausgewählte pathogene MCT8-Varianten denkbar.

1.7.3.2 Bisheriger Forschungsstand zum Einsatz von NaPB bei MCT8-Defizienz

Unterschiede in der Schwere der klinischen Symptome von Patienten mit MCT8-Defizienz, insbesondere in Bezug auf den neurologischen Phänotyp, korrelieren häufig mit einer Restfunktion der pathogenen MCT8-Moleküle (Jansen et al., 2007, 2008). Eine Hypothese zur Erklärung dieser Beobachtung beruht auf der Expression instabiler MCT8-Moleküle, deren Funktion und Expression an der Plasmamembran vom zellulären Kontext abhängen. Gemäß dieser Hypothese wären Organe mit erhaltener MCT8-Expression weniger stark von den Auswirkungen der Mutation betroffen und würden eine geringere Ausprägung klinischer Symptome verursachen. Die Identifizierung von Patienten mit milderem Phänotyp zeigt pathogene Mutationen in *SLC16A2* auf, die für den Einsatz von chemischen und pharmakologischen Chaperonen von Interesse sein können. Sofern die mildere Ausprägung der Krankheitssymptome auf eine instabile MCT8-Variante zurückzuführen ist, könnten in solchen Fällen Chaperone eingesetzt werden um MCT8 zu

stabilisieren und die Expression des Transporters an der Plasmamembran zu erhöhen. Dr. Doreen Braun aus der Arbeitsgruppe von Prof. Ulrich Schweizer konnte in Zellkultur-experimenten zeigen, dass die Mutationen delF501, S194F, S290F, L434W, R445C, L492P und L568P zur Expression instabiler MCT8-Moleküle mit residualer Transportfunktion führen. Durch den Einsatz von NaPB ließen sich Expression und Transportfunktion dieser Moleküle in überexprimierenden MDCK1-Zellen verbessern (Braun & Schweizer, 2015, 2017). Wie bereits zuvor beschrieben, verursacht die Mutation P321L bei betroffenen Patienten einen schweren neurologischen Phänotyp. Trotz des vollständigen Funktionsverlusts von MCT8^{P321L} konnte Dr. Doreen Braun zeigen, dass sich Expression und Transportfunktion der Variante in überexprimierenden MDCK1-Zellen und iBMECs durch Einsatz von NaPB wiederherstellen lassen (Braun et al., 2022; Zung et al., 2024). In MCT8^{P321L}-iBMECs konnte darüber hinaus eine Wirkung von NaPB auf die Funktion weiterer Transporter (u.a. MCT10) nachgewiesen werden, die zu einer zusätzlichen, von MCT8 unabhängigen Aufnahme von Schilddrüsenhormonen führt. P321L-iBMECs zeigen eine erhöhte Expression der endogenen Chaperone HSP47, HSP90B1 und Calreticulin; unter Behandlung mit NaPB kam es zu einer Normalisierung der HSP47-Expression (Doreen Braun, unpublizierte Daten).

Kürzlich konnte der erste klinische Einsatz von Glycerol-Phenylbutyrat (GPB) an 14,5-jährigen, homozygoten Zwillingsbrüdern (siehe auch Absatz 1.5.1) mit MCT8-Defizienz erfolgen. GPB ist ebenso wie NaPB zur Behandlung von Harnstoffzyklusstörungen zugelassen ist (European Medicines Agency, 2015). Die Veresterung von Phenylbutyrat mit Glycerin bietet den Vorteil eines angenehmeren Geschmacks und das Medikament kann als Flüssigkeit verabreicht werden. Auf Grund dieser Vorteile wurde GPB zur Anwendung in diesem Versuch ausgewählt (Zung et al., 2024). Die Brüder sind von der Mutation P321L betroffen und wurden im Vorfeld im Rahmen klinischer Studien bereits mit den thyreomimetischen Substanzen TRIAC und DITPA behandelt. GPB wurde über einen Zeitraum von 13 Monaten in steigender Dosierung von 5,5 g/m²/d bis 21 g/m²/d verabreicht. Unter der Therapie konnte eine Reduktion der freien-T₃-Spiegel (fT₃) und ein Anstieg des freien-T₄ (fT₄) beobachtet werden. Sinkende fT₃-Spiegel waren mit einer Reduktion des Grundumsatzes und einer signifikanten Gewichtszunahme assoziiert. Die Administration von GPB führte zu einer leichten Verbesserung der neurologischen Funktionen. Es konnten positive Effekte auf Hyperreflexie, Motorik und Kognition beobachtet werden

(Zung et al., 2024). Als unerwünschte Arzneimittelwirkung kam es unter hohen Dosen von GPB zu Übelkeit, Erbrechen und einer vorübergehenden Erhöhung der Transaminasen. Diese Symptome sind als häufige unerwünschte Nebenwirkungen von GPB beschrieben (European Medicines Agency, 2015; Zung et al., 2024). Im Rahmen eines weiteren individuellen Heilversuchs, wurde GB zur Behandlung eines 15 Monate alten Jungen mit MCT8-Defizienz eingesetzt (Schreiner et al., 2024). Durch Sequenzierung von *SLC16A2* konnte bei dem Jungen die pathogene Variante MCT8^{V235L} nachgewiesen werden. Die Therapie wurde mit NaPB begonnen und später mit GPB bis zu einer Dosierung von 8,17 g/m²/d über einen Zeitraum von insgesamt 13 Monaten fortgeführt. Unter der Therapie kam es zu einer Reduktion der fT₃- und TSH-Spiegel und einem Anstieg des fT₄. Neben einer Reduktion der systolischen Blutdruckwerte konnte eine Stabilisierung des Körpergewichts und eine Verbesserung der Grobmotorik beobachtet werden. Der Junge zeigte im Zeitraum der Behandlung einen motorischen Entwicklungsfortschritt von 4 zu 6 Monaten auf der Bayley-III-Skala (Schreiner et al., 2024). Auf Grund teilweise erheblicher Erhöhungen der Transaminasen bis auf das Zehnfache des Referenzbereichs, musste die Therapie mehrfach unterbrochen werden (Schreiner et al., 2024).

1.8 Zielsetzung

Auf Grundlage der Hypothese, dass einige Mutationen in MCT8 zur Destabilisierung der Proteinstruktur führen, sollte in dieser Arbeit das Potential von NaPB zur Stabilisierung von MCT8 in einem komplexen Organismus untersucht werden. Hierfür wurde das MCT8^{P253L}-Mausmodell gewählt, da die murine Punktmutation P253L der humanen Mutation P321L entspricht, die in Zwillingen entdeckt wurde. In Zellmodellen wurden bereits vielversprechende Ergebnisse zum Einfluss von NaPB auf MCT8^{P321L} bzw. MCT8^{P253L} gefunden. Um die Auswirkungen der Punktmutation P253L auf die Versuchstiere zu untersuchen, wurde Leber-, Nieren- und Hirngewebe von MCT8^{wt}- und MCT8^{P253L}-Mäusen hinsichtlich Veränderungen in MCT8-Expression, Enzymaktivität und Genexpression untersucht. Der Vergleich entsprechender Gewebeproben von NaCl-behandelten und NaPB-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen sollte Aufschluss über die Wirkung von NaPB im Mausmodell geben. Als Modell für Gliazellen wurden primäre Astrozyten aus den Versuchstieren kultiviert und hinsichtlich ihrer Transportaktivität für T₃ und T₄ untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und vorgefertigte Reagenziensysteme

Verwendete Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen: AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), VWR International (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim). Im Labor verwendete Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Herstellern erworben: Amersham (München), A. Hartenstein (Würzburg), Bio-Rad Laboratories (München), GE Healthcare (München), Invitrogen (Darmstadt), Merck Biosciences (Schwalbach), Eppendorf (Hamburg), peqLab Biotechnologie (Erlangen), Sarstedt (Nümbrecht), und Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim). In der Zellkultur verwendete Medien wurden über Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts.) bezogen. Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur stammten von Sarstedt (Nümbrecht). Die detaillierte Zusammensetzung von verwendeten Puffern und Lösungen wird im Methodenteil genauer beschrieben.

2.1.2 Software und Geräte

Verwendete Software und Geräte sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 2: Software

Programm	Hersteller
Gel doc	Intas
Photoshop CS7 & Illustrator CS7	Adobe
Graph Pad 6	Prism
Word & Excel	Microsoft Office

Tab. 3: Geräte

Gerät	Hersteller
Biophotometer: Genesis 10 uV	ThermoScientific
Centrifuge 5810 R	Eppendorf
Drucker P93D	Mitsubishi
Elektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie GmbH
Epson Perfection V7000 Photo	Epson
Eppendorf <i>research</i> (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf
Feinwaage LPWG-723i	VWR
Fotodetektor Science imaging	Intas
Gamma-Counter, LB 2111 Multi Crystal	Berthold
Gelkammer 45-2010-i	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Homogenisator: Pellet Pestle® Cordles Motor	Kimble®
Infinite M Plex	Tecan
Inkubator MCO-20AIC	PHC
Kühlzentrifuge 5430 R	Eppendorf
Lampe: KL 1500 LCD	Schott
Magnetrührer RCT basic	IKA
Mastercycler nexus GSX1	Eppendorf
Mastercycler nexus GSX1	Eppendorf
Mikro-Dismembrator U	B. Braun, Biotech International
Mikroskop Zellkultur: TELAVAL 31	Zeiss
Mikrozentrifuge	Labnet International
Neubauer-Improved	Marienfeld
Netzgerät Electrophoresis power supply E802	Consort
Netzgerät Electrophoresis Power Supply EV231	Consort
pH-Meter 761 Calimatic	Knick
Photometer NanoDrop 1000	ThermoScientific
Röntgenfilmkassette Hypercassette™	BioRad
Stereomikroskop Stemi 2000-C	Zeiss
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Instruments
Thermomixer comfort	Eppendorf
Transblotsystem	peqLab
Vortex VV3	VWR
Waage BP 2100 S	Sartorius

2.1.3 Mausmodell

Das verwendete Mausmodell wurde durch Substitution einer Base im *Mct8*-Locus mittels CRISPR/Cas9, in Kooperation mit Prof. Dr. Frédéric Flamant vom Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon generiert. Die murine Mutation P253L entspricht der humanen Mutation P321L. Zur Generierung von männlichen MCT8^{P253L}-Mäusen wurden heterozygote Weibchen (MCT8^{P253L/x}) mit C57 black 6/J (C57Bl6/J) Männchen (MCT8^{x/y}) verpaart. Die Tiere wurden in einem Verhältnis geboren, das nach den Mendelschen Regeln zu erwarten war (siehe Tabelle 4). Die Versuchstiere wurden in *individually ventilated cages* (IVC)-Racks in Standardmakrolonkäfigen Typ II L, bei 22 ± 1,5 °C und 55 ± 5 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Im Tierstall war eine künstliche Beleuchtung mit tageslichtähnlichem Spektrum mit Hell-/Dunkelphasen von 12 h im Wechsel installiert. Die Fütterung der Tiere erfolgte mit standardisiertem, pelletiertem Alleinfutter für Mäuse, ad libitum. Trinkwasser wurde autoklaviert und in Tränkeflaschen zur Verfügung gestellt.

Tab. 4: Kreuzungsschema

	P253L	x
x	P253L/x (28)	x/x (23)
y	P253L/y (27)	x/y (26)

Anzahl der geborenen Tiere in Klammern

2.2 Methoden

2.2.1 Genotypisierung

Die folgenden Tierversuche wurden unter dem Aktenzeichen 81-02.04.2019.A144 vom Landesamt für Natur, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt. Jungtiere wurden am Tag der Geburt mittels Schwanzspitzenbiopsie genotypisiert. Das Gewebe wurde in 100 µl alkalischem Lysepuffer inkubiert (45-60 min, 95 °C). Anschließend wurden 100 µl Neutralisationspuffer zugegeben. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist Tabelle 5 zu entnehmen.

Tab. 5: Puffer-Zusammensetzung Genotypisierung

Substanz	Zusammensetzung
Alkalischer Lysepuffer	25 ml dH ₂ O, 62,5 µl 10 M NaOH, 10 µl 0,5 M EDTA, pH 12
Neutralisationspuffer	24 ml dH ₂ O, 1 ml 1 M Tris-HCl, 45 µl 37 % HCl, pH 3
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris, 0,05 M EDTA in dH ₂ O, pH 8,3
TAE-Puffer (1x)	TAE-Puffer 50x, Verdünnung in dH ₂ O
Agarose Gel	3 g (2 %) bzw. 4,5 g (3 %) Agarose (VWR life science) in 150 ml TAE-Puffer, 5 µl Fluoreszenzfarbstoff (HDGreen Plus DNA stain, intas)
Ladepuffer	6x loading dye Orange G

PCR-Ansätze (*polymerase chain reaction*) und Programme sind in Tabelle 6 beschrieben. Nach erfolgter PCR-Reaktion wurden die Proben mit 6x konzentriertem Ladepuffer (loading dye Orange G) versetzt und auf ein 2 % Agarose-Gel aufgetragen. Das PCR Produkt zur Ermittlung des Geschlechts wurde auf ein 3 % Agarose-Gel aufgetragen. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 5 beschrieben. Die Proben wurden bei 120 V unter Mitführen eines Größenstandards (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific) durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Banden (Desoxyribonukleinsäure) unter UV-Licht nachgewiesen und fotografiert.

2.2.2 Behandlung der Mäuse

Im Anschluss an die Genotypisierung wurden die männlichen Jungtiere drei Behandlungsgruppen zugeteilt: MCT8^{P253L}: NaCl (Natrium Chlorid, Lösungsmittelkontrolle), MCT8^{P253L}: NaPB und Kontrollgruppe (MCT8^{wt}; ohne Behandlung). Die Mäuse wurden beginnend mit dem Tag der Geburt täglich mit 200 mg/kgKG NaPB gelöst in NaCl (0,9 %, Fresenius Kabi) behandelt. Die MCT8^{P253L}-Kontrollgruppe erhielt ein äquivalentes Volumen NaCl. Die jeweilige Substanz wurde mit Hilfe von Insulin-Einwegspritzen (Micro-Fine™ 30 G, BD medical) subkutan injiziert. Die Behandlung erfolgte um die Mittagszeit. Die Tiere wurden vor der Behandlung gewogen, das Gewicht notiert und zur Berechnung der Dosis herangezogen. Die Behandlung der Tiere erfolgte in drei Versuchsgruppen für die Dauer von 7, 14 und 21 Tagen.

Tab. 6: PCR-Ansätze

PCR-Ansatz Geschlecht	PCR-Programm Geschlecht
1 µl DNA 0,5 µl 10 µM Primer (jeweils) 1,2 µl 25 mM MgCl₂ (Invitrogen) 0,6 µl 5 mM dNTPs (Thermo Scientific) 2 µl 10x BioTherm™ Puffer (Gene Craft) 0,8 µl BioTherm™ Taq (Gene Craft) ad 20 µl dH₂O	94 °C → 5 min 95 °C → 20 s 54 °C → 60 s 72 °C → 40 s 72 °C → 10 min 35x
Primersequenzen (Eurogentec): ♂: Bandengröße 302 bp + 331 bp, ♀: 331 bp Sex fwd 5'-CTGAAGCTTTTGGCTTTGAG-3' Sex rev 5'-CCACTGCCAAATTCTTTGG-3'	
PCR-Ansatz MCT8-wt	PCR-Programm WT & P253L
2 µl DNA 2 µl 10 µM Primer (jeweils) 1,6 µl 25 mM MgCl₂ (Invitrogen) 0,7 µl 5 mM dNTPs (Thermo Scientific) 3 µl 10x BioTherm™ Puffer (Gene Craft) 1 µl BioTherm™ Taq (Gene Craft) ad 30 µl dH₂O	95 °C → 3 min 95 °C → 30 s 68 °C → 30 s 72 °C → 30 s 10x
PCR-Ansatz MCT8-P253L	
3 µl DNA 3 µl 10 µM Primer (SM1601/SM1603) 0,3 µl 10 µM Primer (CD8/CD8-AS) 1,6 µl 25 mM MgCl₂ (Invitrogen) 0,7 µl 5 mM dNTPs (Thermo Scientific) 3 µl 10x BioTherm™ Puffer (Gene Craft) 0,8 µl BioTherm™ Taq (Gene Craft) ad 30 µl dH₂O	95 °C → 30 s 58 °C → 30 s 72 °C → 30 s 72 °C → 5 min 30x
Primersequenzen (Eurogentec): MCT8-wt – Bandengröße 309 bp SM1605 fwd 5'-AGGTTGGTGGCGAGTGTGG-3' SM1607 rev 5'-TATCCCCCAGCATTTTGTATGAGGAA-3' MCT8-P253L – Bandengröße 309 bp SM1601 fwd 5'-AGGTTGGTGGCGAGTGTGG-3' SM1603 rev 5'-TATCCCCCAGCATTTTAATTAATAAAA-3' Positivkontrolle CD8-S 5'-GGTGCATTCTCACTCTGAGTTCC-3' CD8-AS 5'-GCAGACAGAGCTGATTTCTATGTG-3'	

2.2.3 Probenentnahme

Die Tötung der Versuchstiere wurde unter Befolgung des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Tiere wurden durch Injektion von 2,5 µl/gKG Ketamin (10 %, Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte (WDT)) und 0,5 µl/g Körpergewicht Xylazin (2 %, Serumwerk Bernburg) narkotisiert. Durch Punktion des Herzens wurde der Tod der Tiere vor der Organentnahme sichergestellt. Ausgetretenes Blut wurde schnellstmöglich mit einer Pipette aus den Körperhöhlen entnommen, in Eppendorf-Gefäße überführt und auf Eis gelagert. Zur Gewinnung von Serum wurden die Blutproben zentrifugiert (10 min, 10.000 x g, 4 °C) und der Überstand in frische Eppendorf-Gefäße überführt. Das Serum wurde bei -80 °C gelagert. Entnommene Organe wurden sofort in Flüssigstickstoff gefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Weiterverarbeitung der Proben

Gefrorene Gewebeproben wurden zur weiteren Analyse (Western Blot, qPCR) mit Hilfe einer Kugelmühle (Mikro-Dismembrator U, B. Braun) pulverisiert. Die Proben wurden auf Trockeneis gelagert, Schüttelbehälter und Kugeln wurden in Flüssigstickstoff vorgekühlt. Ein Teil des Organs wurde in den Behälter überführt und in die Kugelmühle eingespannt. Das Gewebe wurde für 1 min bei 2000 rpm zerkleinert. Gewonnenes Gewebepulver wurde in vorgekühlte Eppendorfgefäße (auf Trockeneis) überführt und bei -80 °C gelagert. Aufgrund der Organgröße wurden von den Nieren P7 alter Mäuse Gewebestücke zur Untersuchung abgetrennt. Dazu wurde das Gewebe auf einem -80 °C kaltem Metallblock mit einem heißen Skalpell geschnitten.

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

Verwendete Puffer etc. wurden wie in Tabelle 7 beschrieben, hergestellt.

2.2.5.1 Western-Blot

Zum Proteinnachweis durch Western Blot wurden Proben aus Leber- und Nierengewebe verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden auf Eis gelagert und in 200-300 µl Homogenisationspuffer + 1 mM DTT (Dithiothreitol) gelöst. Zur besseren Zerkleinerung des Gewebes wurde ein Homogenisator (Pellet Pestle® Cordles Motor, Kimble®) genutzt. Die Zellen wurden durch Behandlung mit Ultraschall (6 Zyklen, Amplitude 100)

aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben für 30 min zentrifugiert (14.000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit der Membranfraktion erneut in 100 µl Homogenisationspuffer + 1 mM DTT gelöst. Im Anschluss wurden die Proben erneut mit 6 Zyklen Ultraschall behandelt.

Tab. 7: Zusammensetzung Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Blockierungspuffer	5 % (w/v) Magermilchpulver, 0,3 % (w/v) Tween20 in 1x PBS
Homogenisationspuffer	250 mM Saccharose, 20 mM Hepes, 1 mM EDTA in dH ₂ O, pH 7,4
Gellösung (20 %)	162,3 ml Acrylamid, 65 ml Bisacrylamid, ad 250 ml dH ₂ O
Laemmli-Probenpuffer (4x)	200 mM Tris pH 6,8, 40 % Glycerol, 16 % SDS, 20 % β-Mercaptoethanol, 0,02 % Bromphenolblau in dH ₂ O
Laufpuffer (10x)	1,92 M Glycin, 0,25 M Tris, 1 % (w/v) SDS in dH ₂ O
Laufpuffer (1x)	1:10 Verdünnung Laufpuffer (10x) mit dH ₂ O
PBS (10x)	80 g NaCl, 2 g KCl, 17,8 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 2,5 g KH ₂ PO ₄ in 1 L dH ₂ O, pH 7,4
PBS (1x)	PBS (10 x) 1:10 Verdünnung mit dH ₂ O
Ponceau-Rot	0,1 % Ponceau-Rot in 5 % Essigsäure
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS in dH ₂ O
Transferpuffer (10x)	1,92 M Glycin, 0,25 M Tris in dH ₂ O
Transferpuffer (1x)	100 ml Transferpuffer (10x), 100 ml Methanol, ad 1000 ml dH ₂ O
Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS in dH ₂ O
Waschpuffer	1x PBS + 0,03 % Tween20

Die Proteinkonzentration der Proben wurde mittels Bradford-Assay bestimmt. Dazu wurden 1000 µl Bio-Rad Protein Assay (1:5 Verdünnung) in Küvetten (Sarstedt) vorgelegt und mit 2 µl Probe versetzt. Nach Mischen der Lösung wurden die Küvetten für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Messung der Extinktion bei 595 nm im Biophotometer (Genesis 10 uV, ThermoScientific) konnte der Proteingehalt anhand einer Standardgeraden ermittelt werden. Die Proteinstandards wurden mittels Rinderserumalbumin (0-19 µg/µl) hergestellt.

Die Proteine in den zu untersuchenden Proben wurden mittels 10 % Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) aufgetrennt. Die Zusammensetzung der verwendeten Gele ist Tabelle 8 zu entnehmen.

Tab. 8: Zusammensetzung SDS-Page

	Trenngel (10 %)	Sammelgel (5 %)
H ₂ O	5 ml	6 ml
Trenngelpuffer	5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	3 ml
Gellösung (20 %)	10 ml	3 ml
Temed	20 µl	12 µl
APS (10 %)	200 µl	120 µl
		+ 6 µl Bromphenolblau (0,5 %)

Die benötigte Menge Membranprotein (siehe Tabelle 9) wurde mit Homogenisationspuffer auf 30 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und mit 10 µl Laemmli-Puffer (4x) versetzt. Die Proben wurden für 10 min bei 95 °C inkubiert. Der Gellauf erfolgte bei 65 V im Sammelgel und 130 V im Trenngel in Laufpuffer, bis die 25 kDa Markerbande das Gel verlassen hatte.

Tab. 9: Proteinmenge Western Blot

Gewebe	Proteinmenge		
	1 Woche	2 Wochen	3 Wochen
Leber	100 µg Membranprotein	100 µg Membranprotein	100 µg Membranprotein
Niere	130 µg Membranprotein	145 µg Membranprotein	75 µg Membranprotein

Der Transfer auf eine 0,45 µm Nitrocellulose Membran (Amersham™ Protran™, Cytiva) erfolgte in einem semi-dry Verfahren in einem Transblot-System (peQLab) bei 25 V und 300 mA für 50 min. Der erfolgreiche Proteintransfer wurde durch Ponceau-Rot Färbung kontrolliert. Anschließend wurde die Membran für 30 min bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer inkubiert. Die zum Proteinnachweis verwendeten Antikörperverdünnungen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tab. 10: Antikörperverdünnungen

Antikörper	Verdünnung	Firma
Primäre Antikörper: anti-MCT8 (rabbit) anti-β-Aktin (mouse)	1:1.000 1:15.000	Sigma Prestige Antibodies Sigma Aldrich
Sekundäre Antikörper: anti-mouse anti-rabbit	1:15.000 1:15.000	ThermoScientific ThermoScientific

Die Inkubation im Erstantikörper (MCT8 bzw. Aktin, verdünnt in Blockierungslösung) erfolgte über Nacht (4 °C). Die Membran wurde anschließend in 3 Schritten à 10 min in Waschpuffer gewaschen, dann im Zweitantikörper (anti-rabbit bzw. anti-mouse) inkubiert (45 min, Raumtemperatur) und erneut für 3x10 min gewaschen. Das gesuchte Protein konnte mit Hilfe von ECL-Reagenz (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific) auf einem Chemielumineszenz-Film (FUJI Medical X-Ray Film) detektiert werden. Die Filme wurden eingescannt und am PC mit Hilfe von Adobe Photoshop (CS6) und Adobe Illustrator (CS6) bearbeitet.

2.2.5.2 Dejodase-Assay

Die Proben für die Enzymreaktion im Dejodase Assay wurden wie unter Absatz 2.2.5.1 beschrieben aufbereitet, die Proteinkonzentration wurde durch die Methode nach Bradford bestimmt. Die Zusammensetzung verwendeter Puffer ist Tabelle 11 zu entnehmen. Zur Herstellung einer Chromatografie-Säule wurde eine Einweg-Spritze (BD Discardit, 1 ml) mit einem Filter (Porengröße: 10 µm, MoBiTec) abgedichtet und mit 600 µl Sedaphex LH-20 (GE Healthcare) befüllt. Die Säule wurde anschließend mit 3 ml 0,1 N HCl equilibriert.

Nach Zugabe des Tracers (¹²⁵I-rT₃, Perkin Elmer) wurde mit 3 ml 0,1 N HCl und anschließend mit 3 ml dH₂O gewaschen. Die Radioaktivität wurde mit 1 ml Ethanol: NH₃ (Verhältnis 1:49) eluiert. Das Eluat wurde durch Stickstoff im Wasserbad (80 °C) eingedampft und anschließend in Substratmix (Zusammensetzung siehe Tabelle 12) gelöst. Das Gemisch aus Substratmix und Tracer wurde am Gamma-Counter vermessen. Dazu wurden je 2 ml CH₃COOH in drei Messröhrchen (VWR, 12x75 mm Culture Tubes) vorgelegt und mit je

50 µl Substratmix/Tracer-Gemisch versetzt. Der Zielbereich für die Radioaktivität lag bei 30.000-80.000 cpm.

Tab. 11: Puffer Dejodase-Assay

Puffer	Zusammensetzung
BSA-Stopplösung	10 % (w/v) BSA, 10 mM PTU-Stammlösung, ad 10 ml dH ₂ O
Elutionslösung	10 % (v/v) CH ₃ COOH
KPO ₄ -Puffer	1 M K ₂ HPO ₄ , 10 mM EDTA, pH 9,4 mit NaOH (Puffer A) 1 M KH ₂ PO ₄ , 10 mM EDTA, pH 4,4 mit HCl (Puffer B) Puffer A vorlegen und mit Puffer B bis pH 6,8 titrieren
rT ₃ -Stammlösung	10 mM rT ₃ in 40 mM NaOH, Verdünnung auf 1 mM rT ₃ ebenfalls in 40 mM NaOH
Dowex 50W-X2	60 % (w/v) Dowex gelöst in 10 % (v/v) CH ₃ COOH, Sarpettenspitzen wurden mit Filtern abgedichtet und mit Dowex 50W-X2 befüllt
Sephadex LH20	20 % (w/v) Sephadex LH-20 in 100 ml 0,1 N HCl

Tab. 12: Substratmix Dejodase-Assay

Volumen	Substanz
10 µl	KPO ₄ -Puffer + 10 mM EDTA
2 µl	1 M DTT
0,41 µl	40 mM NaOH
0,1 µl	1 mM rT ₃
ad 50 µl	dH ₂ O

Die Aktivität der DIO1 wurde in Triplikaten bestimmt. Zur Bestimmung der Hintergrundaktivität wurden 6 Negativkontrollen mitgeführt. Je Probe wurden drei Reaktionsgefäße mit 40 µl einer Proteinkonzentration von 0,5 µg/µl vorbereitet und auf Eis gelagert. Übrig gebliebenes Proteinhomogenat wurde auf Eis gelagert aufbewahrt und für eine erneute Prüfung der Proteinkonzentration im Anschluss an die Enzymreaktion verwendet. Anschließend wurden die Proben mit 10 µl dH₂O versetzt. Durch Zugabe von 50 µl Substratmix-/Tracer-Gemisch pro Reaktionsgefäß wurde die Enzymreaktion gestartet. Die Proben wurden für 60 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Lagerung auf Eis und Zugabe von 50 µl BSA-Stopplösung je Probe beendet. Durch Zugabe von 400 µl kalter Trichloressigsäure (TCA) (10 % (v/v))

wurden enthaltene Proteine gefällt. Die Proben wurden zentrifugiert (5 min, 10.000 rpm, 4 °C) und 480 µl des Überstandes auf Dowex 50W-X2-Säulen übertragen. Durch Elution mit 2 ml CH₃COOH wurde freigesetztes ¹²⁵I in die Messröhrchen überführt. Die Aktivität des Eluats wurde am Gamma-Counter vermessen. Im Anschluss an die Enzymreaktion erfolgte eine erneute Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Bradford Methode. Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität der DIO1 wurde der Mittelwert der Triplikate gebildet. Die Enzymaktivität wurde nach der Formel [1] bestimmt:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{2 \times n \times [cpm (\text{Probe}) - cpm (\text{Hintergrund})] \times 1000}{cpm (100 \%) \times m \times t \times 480/550} \quad [1]$$

n	Stoffmenge rT ₃ in nmol
cpm (Probe)	¹²⁵ I-Freisetzung durch enzymatische Dejodierung
cpm (Hintergrund)	¹²⁵ I-Freisetzung durch nicht enzymatische Dejodierung
cpm (100 %)	theoretisch mögliche Dejodierung des gesamten ¹²⁵ I-rT ₃
m	eingesetzte Menge Protein in mg
t	Reaktionszeit in min
450/550	Quotient aus verwendetem Überstand und Gesamtvolumen
Faktor 2	Durch die freie Drehbarkeit des phenolischen Rings um die Diphenyletherbindung des 5'-markierten rT ₃ kommt es statistisch gesehen zur Abspaltung von I und ¹²⁵ I im Verhältnis 1:1

2.2.5.3 Bestimmung der Transaminasenaktivität

Die Messung der Aktivität der Leberenzyme Pyruvat-Transaminase (ALT) und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (AST) erfolgte im Serum 2 Wochen alter Mäuse. Zur Messung der Enzymaktivität wurde ein gekoppelter Enzymtest verwendet. Produkt der Enzymreaktion der ALT (AST) ist Pyruvat (Oxalacetat), das in einer zweiten Reaktion durch die LDH (MDH) mit Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) als Kofaktor zu Laktat (Malat) reduziert wird. Die Menge des entstehenden NAD⁺ kann photometrisch bestimmt werden und ist direkt proportional zur Enzymaktivität der ALT bzw. AST. Serum wurde wie unter 2.2.3 beschrieben, gewonnen. Die Zusammensetzung bzw. Konzentration verwendeter

Reagenzien ist in Tabelle 13 beschrieben. Zur Messung der Enzymreaktion wurden die Proben in Triplikaten auf einer 96well-Platte vorbereitet. Die wells wurden mit 10 µl Serum je Probe befüllt. Ein zusätzliches well wurde als *blank* mitgeführt. Dem Assay-Puffer wurde Laktatdehydrogenase (LDH, Sigma) zur Messung der ALT-Aktivität, bzw. Malatdehydrogenase (MDH, Sigma) zur Messung der AST-Aktivität zugefügt. Pro well wurden 144 µl Assay-Puffer eingesetzt. Anschließend wurden 36 µl Substrat (Alanin/Aspartat) pro well pipettiert. Dem *blank* wurden 36 µl dH₂O zugefügt. Anschließend wurde die Platte für 15 min bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion zu starten, wurden 20 µl des Startpuffers in jedes well gegeben. Die Messung der Proben erfolgte im Tecan Reader bei 37 °C. Die Enzymaktivität wurde bei 340 nm über einen Zeitraum von 10 min im Abstand von 60 s am photometrisch (TecanReader®) bestimmt.

Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde die gemessene Absorption gegen die Zeit aufgetragen. Es wurde eine Trendlinie eingefügt und die Differenz der Absorption zwischen den Zeitpunkten 2 und 3 (x=2 min, x=3 min) bestimmt. Der Wert wurde genutzt um die Enzymaktivität nach der Formel [2] zu berechnen:

$$\frac{GPT}{GOT} - \text{Aktivität} \left(\frac{U}{ml} \right) = \frac{\Delta A_{340} \text{ min}^{-1} * 0,21 \text{ ml}}{3,5 \text{ mM}^{-1} * 0,01 \text{ ml}} \quad [2]$$

ΔA ₃₄₀	gemessene Absorption pro Minute (Bestimmung durch Geradengleichung)
0,21 ml	Eingesetztes Volumen
0,01 ml	Eingesetztes Probenvolumen
ε(NADH) = 6,22 mM ⁻¹ cm ⁻¹	das Volumen pro well hat eine Höhe von 0,562 cm → ε = 3,50 mM ⁻¹

Mit den Messwerten des *blank well* wurde genauso verfahren. Die bestimmte Aktivität wurde als Hintergrund von der berechneten Enzymaktivität abgezogen

Tab. 13: Reagenzien zur Bestimmung der Transaminasen

Substanz	Zusammensetzung
Assay-Puffer	
Tris-HCl pH 7,8	100 mM
NaHCO ₃	10 mM
Pyridoxal-5-phosphate (PLP, Sigma)	0,1 mM
NADH (Sigma)	0,105 mM
dH ₂ O	ad 8 ml
Für ALT zusätzlich	
LDH (Sigma)	1,2 U/ml (0,156 µl/ml Puffer), auf Eis
L-Alanin (AppliChem)	200 mM
Für AST zusätzlich	
MDH (Sigma)	0,6 U/ml (0,045 µl/ml Puffer), auf Eis
Aspartat (Alfa Aesar)	200 mM
Startpuffer	
α-Ketoglutarat (Sigma)	150 mM

2.2.6 Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 Real Time Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Ribonukleinsäure (RNA) wurde aus dem entnommenen Gewebe mittels TRIzolReagenz (Invitrogen) gemäß der beiliegenden Gebrauchsanweisung isoliert. Die Gewebeproben wurden auf Eis gelagert und mit Hilfe eines Homogenisators in 1 ml TRIzol™ gelöst. Durch Zugabe von Chloroform und anschließende Zentrifugation trennte sich das Homogenat in eine wässrige Schicht, eine Grenzsicht und eine untere organische Schicht. RNA reichte sich in der wässrigen Schicht an und wurde in ein separates 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von Isopropanol und erneute Zentrifugation fiel die RNA als gelartiges Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes aus. Um Verunreinigungen zu entfernen wurde das RNA-Pellet mit Ethanol (75 %) gewaschen. Isolierte RNA wurde in dH₂O gelöst, die Konzentration wurde photometrisch ermittelt (NanoDrop®).

Die Synthese von cDNA (*complementary DNA*) aus den RNA-Proben erfolgte gemäß der Anleitung des *iScript cDNA Synthesis Kits* (Bio Rad). Der empfohlene Reaktionsansatz

wurde halbiert (siehe Tabelle 14). Das Produkt der cDNA-Synthese wurde mit dH₂O im Verhältnis 1:5 verdünnt.

Tab. 14: cDNA-Synthese

Ansatz cDNA-Synthese	Reaction Protocoll
5 µl RNA (300 ng ad 5 µl dH ₂ O) 2 µl 5x iScript Reaction Mix 0,4 µl iScript Reverse Transcriptase 2,6 µl Nuclease-free water	25 °C → 5 min 46 °C → 20 min 95 °C → 1 min

Die RT-PCR wurde in Duplikaten unter Verwendung von SYBR-Green (Fermentas) in einem Mastercycler[®] ep realplex (Eppendorf, Hamburg, Germany) durchgeführt. 18S RNA wurde als Housekeeping-Gen zur internen Kontrolle der cDNA-Menge verwendet. Reaktionsansatz und Primersequenzen sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tab. 15: RT-PCR Ansatz

RT-PCR Reaktionsansatz	PCR-Programm
5 µl cDNA 7 µl dH ₂ O 0,25 µl Primer (jeweils) 12,5 µl SYBR-Green (Fermentas)	94 °C → 15 min 95 °C → 2 min <hr/> 95 °C → 70 s 62 °C → 45 s 72 °C → 30 s <hr/> 72 °C → 3 min
Primersequenzen (Eurogentec) DIO1 fwd 5'- CACAGCCGATTTCCATCA -3' DIO1 rev 5'- GCTGCTCTGGTTCTGCATTG -3' 18S fwd 5'-TTG-ACG-GAA-GGG-CAC-CAC-CAG-3' 18S rev 5'-GCA-CCA-CCA-CCC-ACG-GAA-TCG-3'	

2.2.6.2 3'-mRNA-Sequenzierung

Die 3'-mRNA-Sequenzierung erfolgte an Cortexproben von Tieren an Postnataltag 21. mRNA wurde wie unter 2.2.6.1 beschrieben isoliert. Aufgereinigte RNA wurde in dH₂O gelöst. Die Konzentration wurde photometrisch ermittelt (NanoDrop[®]) und auf 120 ng/µl eingestellt. Die 3'-mRNA-Sequenzierung wurde durch die *Next Generation Sequencing* (NGS) Core Facility der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn durchgeführt. Die bioinformatische Aufbereitung der Sequenzierungsergebnisse wurde vom Arbeitsgruppenleiter durchgeführt. Zur bioinformatischen Analyse wurden die Daten mit Hilfe des

QuantSeq 3'-mRNA-Seq Fw. Library Prep Kit (Lexogen, New Hampshire, United States) nach Empfehlungen des Herstellers vorverarbeitet. Die Qualitätskontrolle wurde mit fastqc v0.11.8 durchgeführt. Für die Zuordnung zum GRCm38-Mausgenom (Ensembl Release 102) wurde STAR aligner 2.6.0a nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur statistischen Analyse der Daten wurde das R-Paket DESeq2 (den Empfehlungen des Herstellers folgend) verwendet. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant definiert.

2.2.7 Zellkultur

Die Kultivierung von Zellen erfolgte im Inkubator, bei 37 °C, 5 % CO₂-Anteil und einer Luftfeuchtigkeit von 95 %. Um die Gefahr von Kontaminationen zu verringern wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet (Werkbank). Die Zusammensetzung verwendeter Medien ist Tabelle 16 zu entnehmen.

Tab. 16: Zellkultur Medien

Medium	Zusammensetzung
MDCK1-Medium	DMEM/F12 (Dulbeccos's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) + 10 % FCS (Fetal calve serum) + 1 % PenStrep (Penicillin/Streptomycin (5,000 Units/mL/ 5,000 µg/ml))
Astrozytenmedium	DMEM, high glucose, Pyruvat (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + 10 % FCS + 1 % PenStrep + 1,8 µl β-Mercaptoethanol (14,3 M)

2.2.7.1 MDCK1-Zellen

Zur Untersuchung von humanem MCT8 in Zellkultur wurden MDCK1-Zellen (Madin Darby Canine Kidney Cells) verwendet, die sowohl mit MCT8^{wt} als auch MCT8^{P321L} stabil transfiziert wurden (durchgeführt von Dr. Doreen Braun). Die verschiedenen MCT8-Konstrukte tragen ein N-terminales HA tag (Haemagglutinin), um den Nachweis des Proteins zu erleichtern. Die kryo-konservierten Zellklone wurden nach dem Auftauen in 5 ml MDCK1-Medium überführt und für 5 min bei 1200 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in T175 Flaschen mit 30 ml Medium kultiviert. Neben zwei Klonen MDCK1-MCT8^{P321L} diente MCT8^{wt} als Positivkontrolle, als Negativkontrolle wurden mit dem pcDNA3 Leervektor transfizierte MDCK1-Zellen verwendet. Die Zellen wurden für drei Tage im Brutschrank kultiviert. Das Medium wurde aus den Flaschen entfernt,

anschließend wurde zwei Mal mit 5-8 ml PBS pro Flasche gewaschen. Zum Lösen der Zellen wurden 3 ml Trypsin (1x) pro Flasche zugesetzt. Die Flaschen wurden für ca. 10 min im Brutschrank bei 37 °C gelagert, bis die Zellen sich vom Flaschenboden gelöst hatten. Zum Inaktivieren des Trypsins wurden 7 ml MDCK1-Medium je Flasche zugegeben. Nach Vereinzeln der Zellen wurde die Zellsuspension in Falcons mit jeweils 5 ml frischem MDCK1-Medium überführt und gut durchmischt. Zur Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer wurden jeweils 10 µl der Zellsuspension entnommen. Zur Messung der T₃-Aufnahme wurden MDCK1-Zellen in zwei 24well Platten ausgesät. Zum Nachweis der Proteinexpression mittels Western Blot wurden zusätzlich Zellen in 6well Platten ausgesät.

Tab. 17: Zellzahl

Klon	Zellen/24 well	Zellen/6 well
MCT8 ^{wt}	12.500	56.250
MCT8 ^{P253L}	30.000	135.000
pcDNA3	60.000	270.000

Nach dem Aussäen wurden die Zellen für 24 h kultiviert und anschließend für 48 h mit 4 mM NaPB behandelt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Die Behandlung mit NaPB (SantaCruz) bzw. NaPB (Sigma) erfolgte auf getrennten well-Platten (siehe Abbildung 1). Für das T₃-Aufnahmeexperiment wurde ein Duplikat pro Klon als unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Für den Nachweis der Proteinexpression diente ein well pro Klon als unbehandelte Kontrolle.

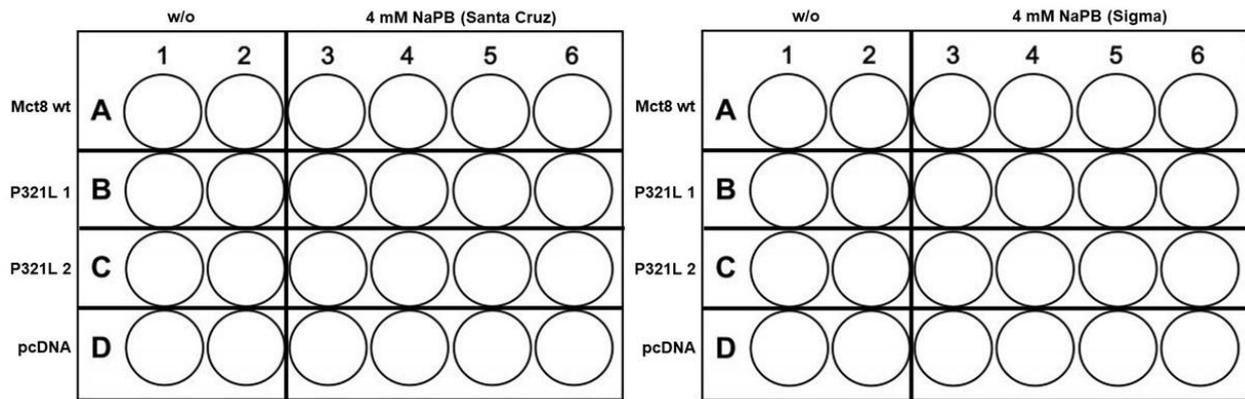


Abb. 1: Behandlung von MDCK1-Zellen MCT8-überexprimierende MDCK1-Zellen wurden für 48 h mit 4 mM NaPB der Firma Santa Cruz bzw. Sigma Aldrich behandelt.

Die Zellen für den Western Blot wurden nach 48 h Behandlung geerntet. Dazu wurde das Medium abgekippt, anschließend die Platte auf Eis mit kaltem PBS gewaschen und 500 µl kaltes PBS pro well zugesetzt. Die Zellen wurden mit der Rückseite einer Pipettenspitze vom Plattenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde in Eppendorf Gefäße überführt, Zellreste wurden durch Zusatz weiterer 500 µl PBS aus den wells entfernt. Die Eppendorf-Gefäße wurden bei 1000 x g, 4 °C, für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 50 µl Homogenisationspuffer (Tabelle 7) + 1 mM DTT resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford Methode ermittelt. MCT8 wurde durch Western Blot aus Ganzzelllysat nachgewiesen, Bradford-Assay, SDS-Page und Membrantransfer erfolgten wie unter 2.2.5.1 beschrieben. Es wurden 15 µg Gesamtprotein aufgetragen. Der Nachweis von MCT8 erfolgte durch HA-Antikörper (1:1000), β-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet

2.2.7.2 Primäre Astrozyten

Zur Anzucht primärer Astrozyten wurden PLL beschichtete Zellkulturplatten verwendet. Die Beschichtung der Platten erfolgte mindestens 24 h vor der Anzucht der Zellen. Zur Herstellung einer Gebrauchslösung wurde PLL (Sigma) mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml in PBS gelöst. 6well-Platten wurden mit 1,5 ml pro well beschichtet. Für 24well-Platten wurden 0,5 ml Gebrauchslösung pro well verwendet. Die Platten wurden für 45 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Überschüssige Flüssigkeit wurde durch

Absaugen entfernt. Anschließend wurden die Platten mit DPBS (1x) gewaschen und unter dem Abzug getrocknet.

Primäre Astrozyten wurden aus Hirngewebe neugeborener (bis Postnataltag 3), männlicher Mäuse isoliert. Nach dem Tod der Tiere wurde eine Schwanzspitzenbiopsie entnommen. Es erfolgte eine Genotypisierung anhand der Biopsie wie in Absatz 2.2.1 beschrieben. Nach Dekapitation wurde das Gehirn entnommen und in eine Petrischale mit eiskaltem HBSS+ (*Hanks' balanced Salt Solution* mit Ca^{2+} , Mg^{2+}) überführt. Die Hirnhälften wurden voneinander getrennt und die Meningen sorgfältig vom Hirngewebe entfernt. Gewonnene Hirne wurden separat in Falcons mit HBSS+ auf Eis gelagert. Unter einer Sterilbank wurde das HBSS+ entfernt und durch 5 ml HBSS- (*Hanks' balanced salt solution* ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}) ersetzt. Die Hirne wurden ein weiteres Mal mit HBSS- gewaschen, das anschließend bis auf 2 ml entfernt wurde. Um die Zellverbände zu lösen, wurde jeweils 1 ml Trypsin (2,5 %) zugegeben und die Hirne für 5-10 min bei 37 °C inkubiert. Um den Verdau zu beenden, wurden 5 ml Astrozytenmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 16) zugegeben. Das Medium wurde bis auf 4 ml abgesaugt und das Gewebe mit einer 10 ml Pipette trituriert. Um größere Gewebestücke zu entfernen, wurden die Proben zentrifugiert (60 s, 300 rcf) und der Überstand in 50 ml Falcons überführt. Die Falcons wurden mit Astrozytenmedium auf 12 ml aufgefüllt. Aus zerstörten Zellen freigesetzte DNA wurde als Wolke sichtbar und mit einer Pasteurpipette entfernt. Anschließend wurde mit Astrozytenmedium entsprechend der benötigten Menge aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde auf Poly-L-Lysin beschichtete Platten verteilt. Pro Tier wurden 8 *wells* auf zwei 24*well*/Platten für die Transportmessungen und 2 *wells* einer 6*well*/Platte zur Proteinbestimmung angelegt (siehe Abbildung 2). Die Zellkulturplatten wurden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurden isolierte Astrozyten 1x gewaschen. Dazu wurde das alte Medium entfernt, eine kleine Menge frisches Astrozytenmedium zugesetzt, kurz geschwenkt und wieder abgesaugt. Die Zellen wurden mit frischem Astrozytenmedium versetzt und erneut bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. In den nächsten zwei Wochen wuchsen die Astrozyten im gleichen Medium, Neurone und Mikroglia starben ab. Nach zwei Wochen wurden abgestorbenen Zellen durch 2 h Schütteln bei 37 °C gelöst und durch anschließenden Wechsel des Mediums entfernt. Nach 14 Tagen erreichten die Astrozyten Konfluenz und konnten mit NaPB behandelt werden. Die Behandlung erfolgte mit 5 mM NaPB gelöst in

Astrozytenmedium über 7 Tage. Pro Zellklon diente die Hälfte der *wells* als unbehandelte Kontrolle (siehe Abbildung 2).

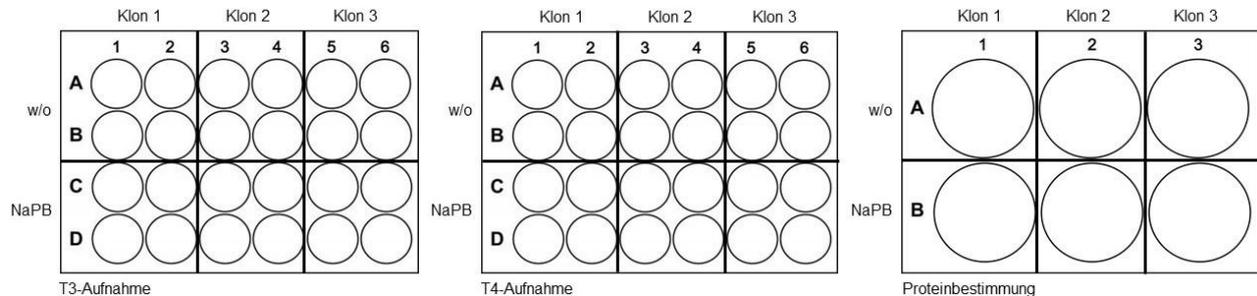


Abb. 2: Astrozyten aussäen

2.2.8 Radioaktive Transportmessungen

Die Aufnahme von T_3 bzw. T_4 in primäre Astrozyten wurde mit Hilfe von radioaktiv markierten Schilddrüsenhormonen bestimmt. Benötigter radioaktiver Tracer wurde wie unter 2.2.5.2 beschrieben aufgereinigt und in Astrozytenmedium resuspendiert. Neben 2 nM ^{125}I - T_3 (bzw. ^{125}I - T_4) wurden dem Medium 10 nM nicht markiertes T_3 (kaltes T_3 bzw. T_4), gelöst in 20 mM NaOH und Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittelkontrolle zugefügt. In einem zweiten Ansatz wurde dem Medium zusätzlich 10 μM Silychristin (SC) gelöst in DMSO zugesetzt. Das Medium wurde aus den zu untersuchenden Zellkultur-Platten abgekippt, pro *well* wurden 300 μl Medium mit Tracer hinzugefügt. Negativkontrollen und zwei der vier behandelten *wells* wurden mit Medium + SC versetzt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Platte wurde für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium-Tracer-Gemisch abgekippt und die Platte auf Eis zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Zur Lyse der Zellen wurden 500 μl 40 mM NaOH zugefügt. Nach kurzer Inkubation unter Schwenken wurde der Inhalt der *wells* in Meßröhrchen überführt und am Gamma-Counter vermessen. Im Anschluss an die Aufnahme-Experimente wurden die 6 *well*-Platten zur Proteinbestimmung mittels Bradford-Methode genutzt. Dazu wurde wie unter 2.2.7.1 und 2.2.5.1 beschrieben verfahren. Anschließend wurde die gemessene Transportaktivität anhand der Proteinkonzentration normiert.

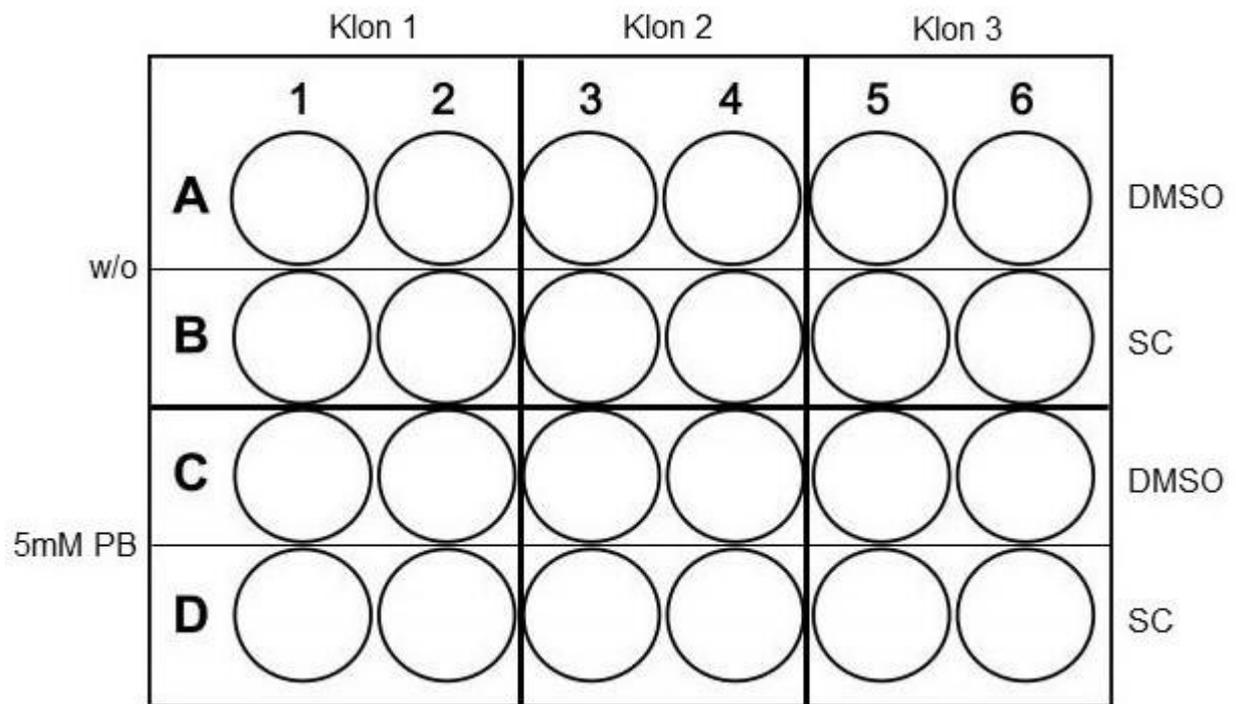


Abb. 3: T₃-/T₄-Aufnahme in primäre Astrozyten

3. Ergebnisse

3.1 NaPB verbessert Expression und Transportaktivität von MCT8^{P321L} in MDCK1-Zellen
In überexprimierenden MDCK1-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass NaPB die Expression verschiedener pathogener MCT8-Varianten erhöht und ihre Transportfähigkeit verbessert (Braun & Schweizer, 2017). Nach den Versuchen in Zellkultur sollte in dieser Arbeit die Wirksamkeit von NaPB im Mausmodell überprüft werden. Auf Grund des Arzneimittelstandards des Präparates wurde im Rahmen der Behandlung von Mäusen NaPB der Firma Sigma Aldrich verwendet, während NaPB für die Versuche in Zellkultur über die Firma Santa Cruz bezogen wurde. Die Firmen geben die Reinheit ihrer Präparate mit $\geq 97,5\%$ (Sigma Aldrich) bzw. $\geq 98\%$ (Santa Cruz) - ermittelt durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie - an (Santa Cruz, 2024; Sigma Aldrich, 2024). Vor Beginn des Tierversuchs wurden beide Substanzen in Zellkultur verglichen, um eine äquivalente Wirksamkeit sicherzustellen.

Zur Bestimmung der MCT8-Expression wurden MCT8^{P321L} überexprimierende MDCK1-Zellen (Madin-Darby canine kidney) kultiviert und für jeweils 48 h mit 4 mM NaPB der Firma SantaCruz bzw. 4 mM NaPB der Firma Sigma Aldrich behandelt. Neben zwei Klonen MDCK1-MCT8^{P321L} wurde ein Klon MDCK1-MCT8^{wt} als Positivkontrolle kultiviert. Als Negativkontrolle wurden mit dem pcDNA3-Leervektor transfizierte MDCK1-Zellen verwendet. Der Nachweis der MCT8-Expression erfolgte mittels Western Blot. MDCK1-MCT8^{P321L}-Zellen zeigten eine deutlich verringerte Expression von MCT8 im Vergleich zu MDCK1-MCT8^{wt}-Zellen (Abbildung 4). Die Behandlung mit 4 mM NaPB (SantaCruz) führte ebenso wie die Behandlung mit 4 mM NaPB (Sigma) zu einer Erhöhung der Expression von MCT8^{P321L} auf Wildtyp-Niveau (Abbildung 4). In der Negativkontrolle (MDCK1-pcDNA3) war kein MCT8 nachweisbar.

Um die Transportfähigkeit von MCT8 zu ermitteln, wurde die Aufnahme von radioaktiv markiertem T₃ in MDCK1-Zellen bestimmt. Für das Aufnahmeexperiment wurden drei Duplikate pro MCT8^{P321L}-Klon kultiviert. Zwei der Duplikate wurden für 48 h mit jeweils 4 mM NaPB der beiden Firmen behandelt, das dritte Duplikat blieb unbehandelt. Eines der behandelten Duplikate wurde während des Aufnahmeexperiments zusätzlich mit Silychristin (SC) versetzt. SC wirkt als spezifischer Inhibitor von MCT8 (Johannes et al., 2016) und wurde in diesem Experiment verwendet um sicherzustellen, dass die gesteigerte T₃-

Aufnahme auf die verbesserte Transportaktivität von MCT8^{P321L} zurückzuführen ist und nicht durch etwaige andere endogene Transporter vermittelt wurde.

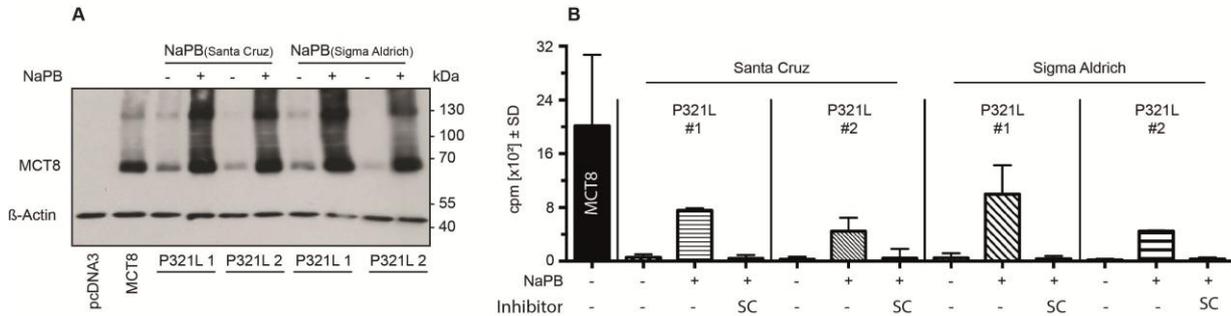


Abb. 4: NaPB verbessert Expression und Transportfähigkeit von MCT8^{P321L} in überexprimierenden MDCK1-Zellen.

A) Western Blot MCT8^{P321L}-überexprimierender MDCK1-Zellen nach 48 h Behandlung mit 4 mM NaPB (SantaCruz) bzw. NaPB (Sigma). MCT8 wurde in 10 µg Gesamtzellsat nachgewiesen. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Durch Behandlung mit beiden Substanzen ließ sich die Expression von MCT8^{P321L} in vergleichbarem Maß verbessern. B) Aufnahme von radioaktiv markiertem T₃ (¹²⁵I-T₃) in überexprimierende MDCK1-Zellen nach 48 h Behandlung mit 4 mM NaPB (SantaCruz) bzw. 4 mM NaPB (Sigma). In unbehandelten MCT8^{P321L}-MDCK1-Zellen war die Aufnahme von T₃ kaum nachweisbar. Die Behandlung der Zellen mit 4 mM NaPB der Firma Santa Cruz bzw. Sigma führte zu einem deutlichen Anstieg der T₃-Aufnahme. Durch Inkubation mit dem MCT8-spezifischen Inhibitor Silychristin (SC) war dieser Effekt reversibel. Die Aufnahme von ¹²⁵I-T₃ in MDCK1-pcDNA3 Zellen wurde als Hintergrund von den gemessenen Werten abgezogen.

Unbehandelte MCT8^{P321L}-Zellen zeigten im Vergleich zu MCT8^{wt}-Zellen eine sehr geringe Aufnahme von ¹²⁵I-T₃. (Abbildung 4). Sowohl die Behandlung mit NaPB (SantaCruz) als auch mit NaPB (Sigma) führte zu einem deutlichen Anstieg der ¹²⁵I-T₃-Aufnahme. Nach Zugabe von 10 µM SC war nahezu keine Aufnahme von ¹²⁵I-T₃ in die behandelten Zellen messbar (Abbildung 4), sodass die gesteigerte T₃-Aufnahme auf MCT8 zurückgeführt werden kann.

3.2 Die körperliche Entwicklung von MCT8^{P253L}-Mäusen ist nicht beeinträchtigt

Typisch für Kinder mit MCT8-Defizienz ist eine Verzögerung der körperlichen Entwicklung mit teilweise schwerem Untergewicht und verzögertem Wachstum im Vergleich zu gesunden Gleichaltrigen (Groeneweg et al., 2020). Unter der Behandlung mit NaPB sind sowohl Gewichtsverlust, als auch Gewichtszunahme als seltene Nebenwirkung beschrieben (European Medicines Agency, 2015). Um Einflüsse der Mutation P253L und der Behandlung

mit NaPB auf die körperliche Entwicklung der Versuchstiere zu erfassen, wurden die Tiere im Versuchszeitraum täglich gewogen und am Tag der Organentnahme gemessen (Körperlänge von der Nase bis zur Schwanzwurzel). Nach der Geburt wurden die Tiere drei Versuchsgruppen zugeteilt (Postnatal Tag 7 (P7), P14 und P21). Innerhalb der drei Versuchsgruppen erfolgte eine Aufteilung der Tiere nach Genotyp in NaPB-behandelte $MCT8^{P253L}$ -Mäuse, NaCl-behandelte $MCT8^{P253L}$ -Mäuse und $MCT8^{wt}$ -Mäuse. Tiere einer Versuchsgruppe wurden hinsichtlich ihrer körperlichen Entwicklung miteinander verglichen.

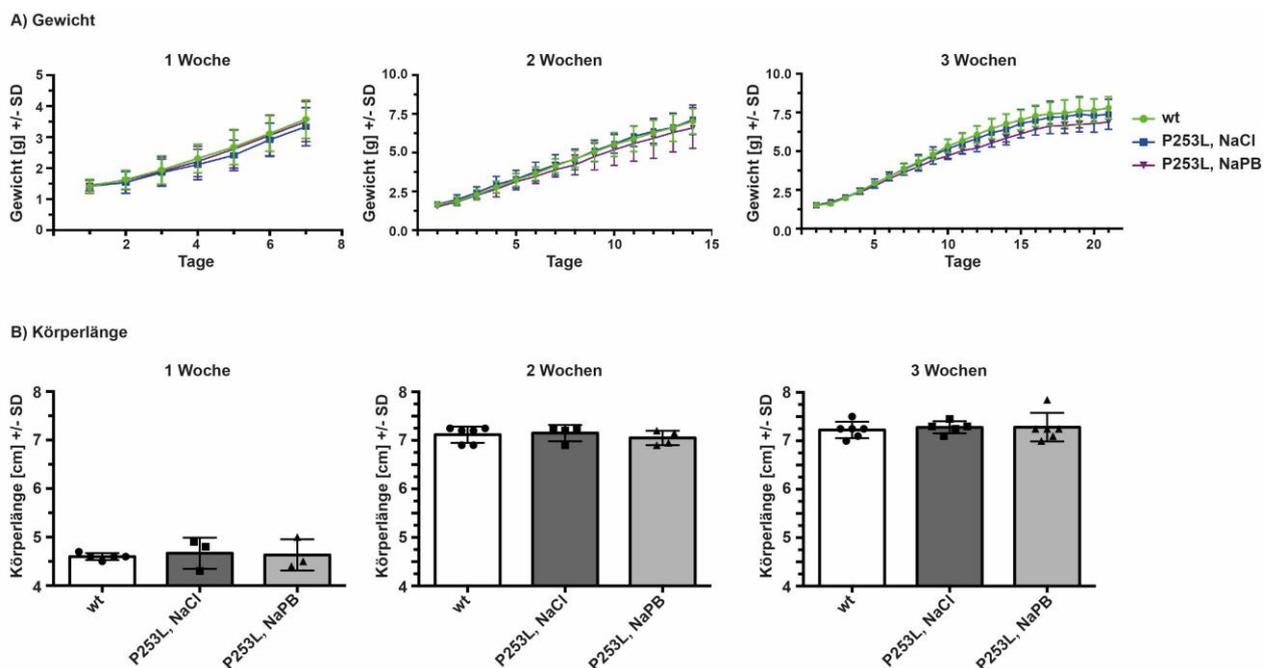


Abb. 5: Körperliche Entwicklung von $MCT8^{P253L}$ -Mäusen

Versuchstiere wurden ab Geburt für die Dauer der Behandlung täglich gewogen und am Tag der Organentnahme von der Nasenspitze bis zur Schwanzwurzel gemessen. Körpergröße und -gewicht von Tieren der gleichen Versuchsgruppe bewegten sich unabhängig vom Genotyp und der erhaltenen Behandlung in der gleichen Größenordnung.

Weder der Genotyp, noch die Behandlung mit NaPB hatten einen Einfluss auf die körperliche Entwicklung der Tiere. Gewicht und Körpergröße von NaPB-behandelten $MCT8^{P253L}$ -Mäusen lagen in der gleichen Größenordnung wie Gewicht und Größe von NaCl-behandelten $MCT8^{P253L}$ -Mäusen und $MCT8^{wt}$ -Mäusen gleichen Alters (Abbildung 5).

3.3 Unauffällige Transaminasen im Serum von NaPB-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen an Postnataltag 14

Eine milde Erhöhung der Transaminasen unter Einnahme von NaPB ist als häufige Nebenwirkung des Medikaments beschrieben (European Medicines Agency, 2009). Auch während der Behandlung von MCT8-defizienten Zwillingen mit hohen Dosen GPB kam es zu einer reversiblen Erhöhung der Leberenzyme (Zung et al., 2024). Die Therapie eines 15 Monate alten Jungen mit GPB musste auf Grund teils erheblicher Erhöhungen der Transaminasen (bis auf das Zehnfache des Referenzbereichs), mehrfach unterbrochen werden (Schreiner et al., 2024). Um eine mögliche Belastung der Leber der Versuchstiere durch die Behandlung mit NaPB zu prüfen, wurde die Aktivität der Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) im Serum der Tiere an Postnataltag 14 bestimmt.

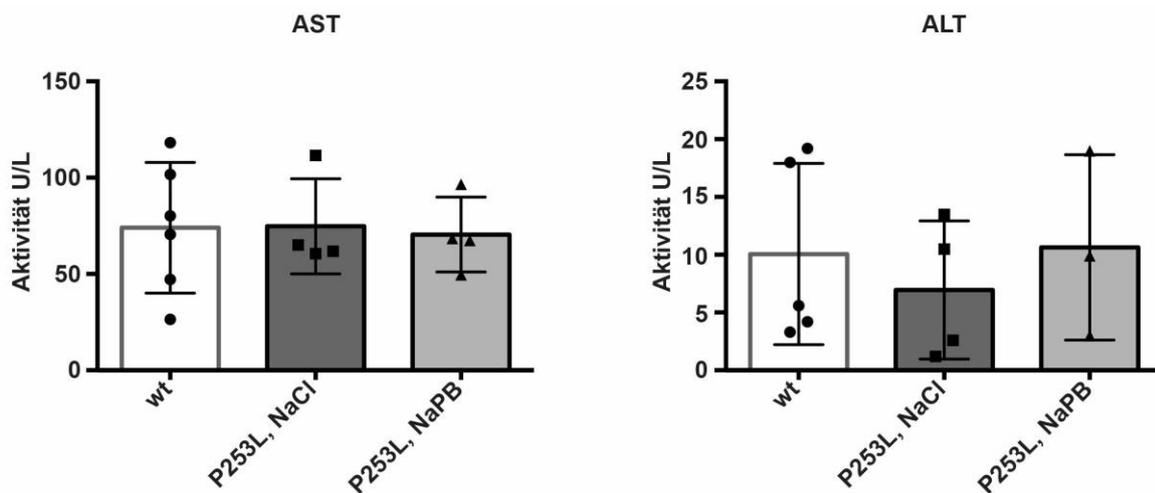


Abb. 6: Transaminasen im Serum von MCT8^{P253L}-Mäusen unter Behandlung mit NaPB. Die Aktivität der Transaminasen Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) wurde im Serum von MCT8^{wt}, NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen und NaPB-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen an Postnataltag 14 bestimmt. Die Enzymreaktion wurde an Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) gekoppelt und die Extinktion bei 340 nm und 37 °C über 15 min im Tecan Reader gemessen. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte anhand einer Standardgeraden. Im Vergleich zu MCT8^{wt}-Mäusen zeigten weder NaPB-behandelte MCT8^{P253L}-Mäuse, noch NaCl-behandelte MCT8^{P253L}-Mäuse eine erhöhte Aktivität der Transaminasen im Serum.

Mit NaPB behandelte MCT8^{P253L}-Mäuse zeigten im Vergleich zu NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen und MCT8^{wt}-Mäusen keine erhöhten Transaminasen (Abbildung 6).

In Studien an C57Bl/6J-Mäusen bewegten sich die Serum-Spiegel von AST bzw. ALT gesunder Tiere im Bereich von 32-122 U/L bzw. 4-94 U/L, sodass die in diesem Versuch gemessenen Werte als normwertig angesehen werden können (Otto et al., 2016; Wagnerberger et al., 2013).

3.4 Die Expression von MCT8 in MCT8^{P253L}-Mäusen variiert in Abhängigkeit vom Zelltyp
 Untersuchungen an Zellmodellen haben gezeigt, dass die Expression von MCT8^{P321L} (entspricht der murinen Variante MCT8^{P253L}) vom Zelltyp abhängt. In iBMECs und MDCK1-Zellen war die Expression von MCT8^{P321L} reduziert, während COS-1, JEG3 und Flp-in-293-Zellen eine erhaltene Expression des Transporters zeigen (Abbildung 4)(Braun et al., 2022; Kersseboom et al., 2013; Vatine et al., 2017).

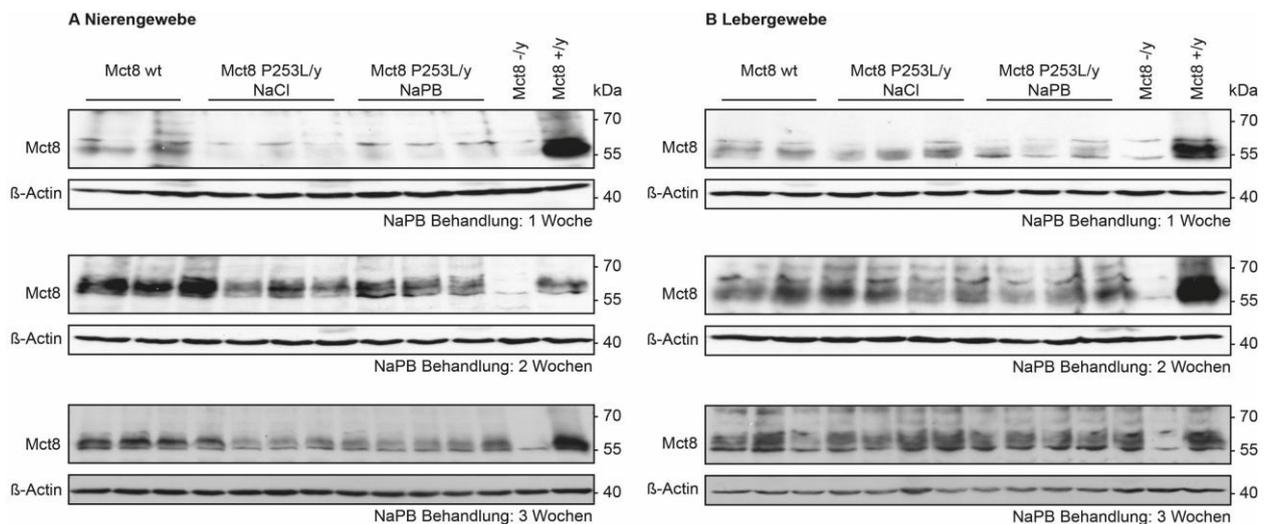


Abb. 7: MCT8-Expression in Leber- und Nierengewebe von MCT8^{P253L}-Mäusen
 Nachweis der MCT8-Expression in Nieren- (A) und Lebergewebe (B) von MCT8^{wt}-Mäusen und MCT8^{P253L}-Mäusen nach subkutaner Applikation von 200 mg/kgKG NaPB bzw. eines äquivalenten Volumens NaCl für 7, 14 und 21 Tage durch Western Blot. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Die Expression von MCT8 in Nierengewebe von NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen und NaPB-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen war im Vergleich zu MCT8^{wt}-Mäusen in allen Versuchsgruppen reduziert. Lebergewebe von NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen und NaPB-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen zeigte keine Reduktion der MCT8-Expression. Die Behandlung der Tiere mit NaPB hatte weder in Nieren-, noch in Lebergewebe einen erkennbaren Einfluss auf die Expression von MCT8.

Durch den Einsatz von NaPB konnte die Expression von MCT8^{P321L} in iBMECs verbessert werden (Braun et al., 2022). Um die Auswirkungen der Mutation P253L und den Einfluss

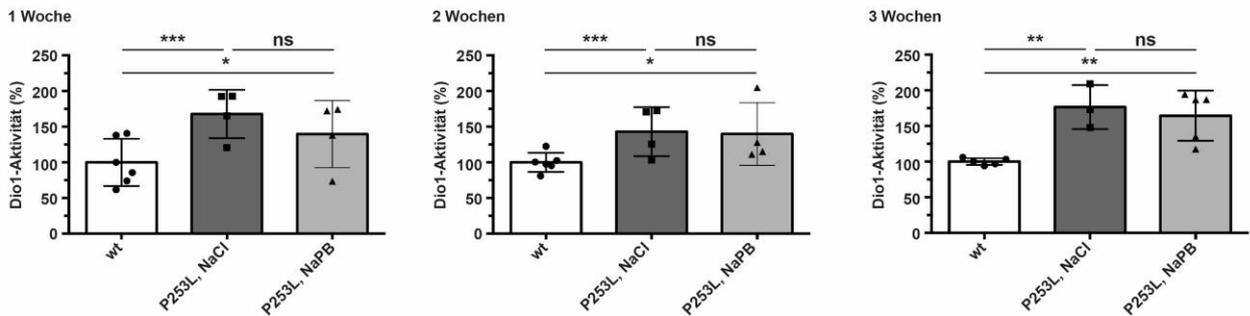
der NaPB-Behandlung auf die MCT8-Expression in peripherem Gewebe der Versuchstiere zu untersuchen, wurde MCT8 in Leber- und Nierengewebe durch Western Blot nachgewiesen. Die Expression von MCT8 in Nierengewebe von NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen war im Vergleich zu MCT8^{wt}-Mäusen reduziert (Abbildung 7). Überraschenderweise konnte in Lebergewebe von NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen keine Reduktion der MCT8-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 7). Die Behandlung von MCT8^{P253L}-Mäusen mit 200 mg/kgKG NaPB hatte weder in Nieren-, noch in Lebergewebe einen erkennbaren Effekt auf die Expression von MCT8 (Abbildung 7).

3.5 Leber- und Nierengewebe von MCT8^{P253L}-Mäusen zeigt Zeichen der peripheren Hyperthyreose

Kinder mit MCT8-Defizienz fallen in Blutuntersuchungen durch ein erhöhtes Serum T₃, bei gleichzeitig niedrigen T₄-Spiegeln und normwertigem bis leicht erhöhtem TSH auf (Groeneweg, Van Geest, et al., 2019). Auch in *Mct8*ko-Mäusen und adulten MCT8^{P253L}-Mäusen wurde diese charakteristische Konstellation der Serumparameter beobachtet (Dumitrescu et al., 2006; Valcárcel-Hernández et al., 2022; Wirth et al., 2011). Eine wirksame Therapie zur Behandlung der MCT8-Defizienz, sollte neben einer Verbesserung der neurologischen Defizite auch zu einer Normalisierung der derangierten Hormonspiegel führen. Bereits in zwei Behandlungsversuchen an Patienten mit MCT8-Defizienz zeigte GPB einen positiven Einfluss auf die veränderten Schilddrüsenhormonspiegel der Patienten (Schreiner et al., 2024; Zung et al., 2024). Bei der Untersuchung von juvenilen Mäusen gestaltet sich die Messung von Hormonen im Serum auf Grund der kleinen Blutmenge schwierig. Um den Status der Schilddrüsenhormone im Blut der Versuchstiere zu evaluieren, wurden daher indirekte Parameter genutzt. Anhand von Proteinen, deren Expression einer Regulation durch T₃ unterliegt, können Rückschlüsse auf die T₃-Spiegel im Blut gezogen werden. Zu diesen Proteinen gehört unter anderem das Enzym Dejodase 1 (DIO1), das die Umwandlung des Prohormons T₄ zu T₃ und zu inaktivem rT₃ katalysiert. DIO1 wird vor allem in Leber, Niere, Schilddrüse und der Hypophyse exprimiert und unterliegt einer positiven Regulation durch T₃ (Bianco et al., 2002). Um Unterschiede zwischen MCT8^{P253L}-Mäusen und MCT8^{wt}-Mäusen, sowie die Auswirkungen der Behandlung mit NaPB zu ermitteln, wurde die Aktivität der DIO1 in Leber- und Nierengewebe mit Hilfe eines radioaktiven Enzymassays bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression der DIO1

durch RT-PCR ermittelt. Die Aktivität der DIO1 in Nierengewebe von NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen und NaPB-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen war in allen Versuchsgruppen gegenüber MCT8^{wt}-Mäusen erhöht und deutet damit auf eine hyperthyreote Stoffwechsellaage in Nierengewebe von juvenilen MCT8^{P253L}-Mäusen hin.

A) Enzymaktivität



B) mRNA-Level

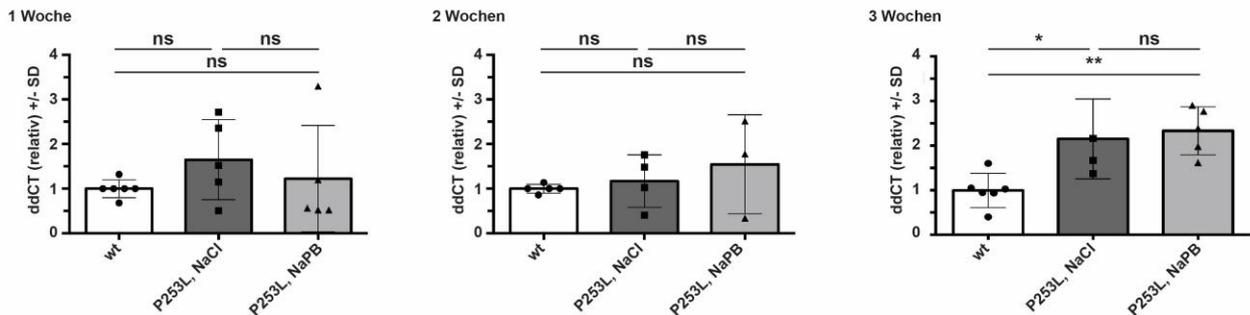


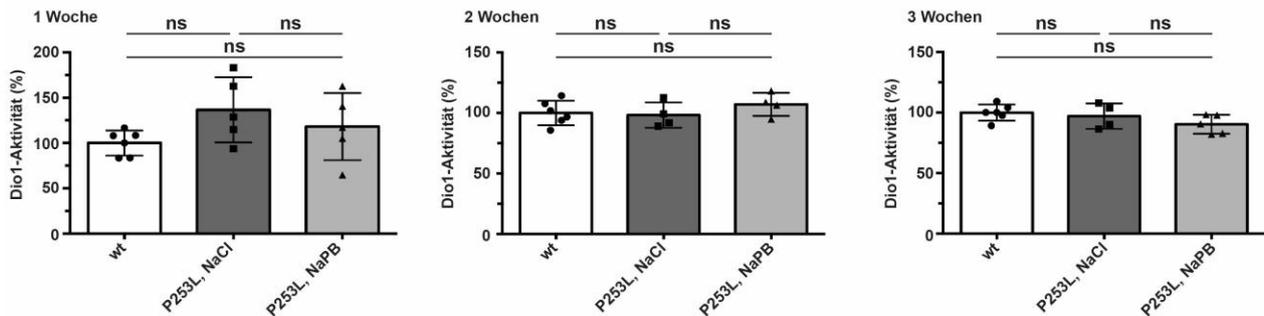
Abb. 8: Enzymaktivität und Expression der Dejodase 1 in Nierengewebe von MCT8^{P253L}-Mäusen

Nachweis von Aktivität (A) und mRNA Expression (B) der Dejodase 1 in Nierengewebe von MCT8^{wt}-Mäusen und MCT8^{P253L}-Mäusen nach subkutaner Applikation von 200 mg/kgKG NaPB bzw. eines äquivalenten Volumens NaCl für 7, 14 und 21 Tage. Die DIO1 Aktivität wurde mit Hilfe von radioaktiv markiertem rT₃ (¹²⁵I-rT₃) bestimmt, mRNA-Level wurden durch RT-PCR ermittelt und mit 18S-rRNA normalisiert. Die DIO1 Aktivität in Nierengewebe von NaPB-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen und NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen war in allen Versuchsgruppen gegenüber MCT8^{wt}-Mäusen signifikant erhöht. Die mRNA-Level der *Dio1* in NaPB-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen und NaCl-behandelte MCT8^{P253L}-Mäusen waren erst ab Postnataltag 21 signifikant erhöht. Der Einsatz von NaPB hatte keinen signifikanten Einfluss auf Enzymaktivität oder Expression der DIO1. Einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Test für multiple Vergleiche. *p*-Werte: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001, **** < 0,0001.

Die Behandlung der Tiere mit NaPB hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivität (Abbildung 8). Die *Dio1*-mRNA-Level in Nierengewebe von NaCl-behandelten

MCT8^{P253L}-Mäusen und NaPB-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen waren erst ab Postnataltag 21 signifikant höher als in MCT8^{wt}-Mäusen. Auch auf die Expression der DIO1 hatte die Behandlung mit NaPB keinen erkennbaren Einfluss (Abbildung 8).

A) Enzymaktivität



B) mRNA-Level

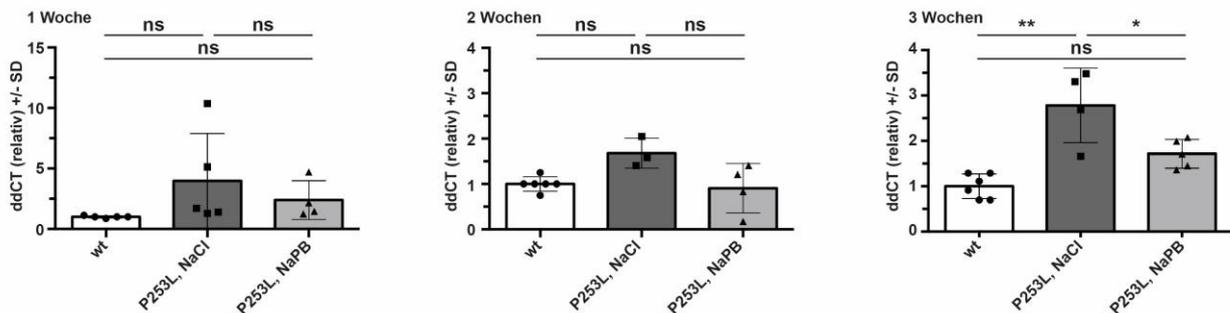


Abb. 9: Enzymaktivität und mRNA-Level der Dejodase 1 in Lebergewebe von MCT8^{P253L}-Mäusen

Nachweis von Aktivität (A) und Expression (B) der DIO1 in Lebergewebe von MCT8^{wt}-Mäusen und MCT8^{P253L}-Mäusen nach subkutaner Applikation von 200 mg/kgKG NaPB bzw. eines äquivalenten Volumens NaCl für 7, 14 und Tage. Die DIO1 Aktivität wurde mit Hilfe von radioaktiv markiertem rT₃ (¹²⁵I-rT₃) bestimmt, mRNA-Level wurden durch RT-PCR ermittelt und mit 18S-rRNA normalisiert. Die DIO1 Aktivität in Lebergewebe von NaPB-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen und NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen war in allen Versuchsgruppen mit der von MCT8^{wt}-Mäusen vergleichbar. Der Einsatz von NaPB hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Enzymaktivität. Die mRNA-Lever der *Dio1* waren in NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen der Versuchsgruppe P21 signifikant erhöht und ließen sich durch die Behandlung mit NaPB-senken. Statistische Analyse: Einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Test für multiple Vergleiche. *p*-Werte: * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$, **** $<0,0001$

Überraschenderweise war die DIO1-Aktivität in Lebergewebe von NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen und NaPB-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen in allen Versuchsgruppen mit der von MCT8^{wt}-Mäusen vergleichbar. Auch in Lebergewebe zeigte NaPB keinen

erkennbaren Effekt auf die Enzymaktivität (Abbildung 9). Wie in Nierengewebe, ließ sich auch in Lebergewebe von NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen an Postnataltag 21 eine signifikant erhöhte Expression der DIO1 nachweisen. Zudem konnten die erhöhten *Dio1*-mRNA-Level in Lebergewebe durch Behandlung mit NaPB reduziert werden (Abbildung 9).

3.6 Juvenile MCT8^{P253L}-Mäuse zeigen eine veränderte Expression T₃-regulierter Gene im cerebralen Cortex

Das klinische Bild der MCT8-Defizienz wird insbesondere durch die neurologischen Auffälligkeiten der Patienten geprägt, die schwere Entwicklungsstörungen in den Bereichen Sprache, Motorik und Kognition umfassen (Groeneweg et al., 2020). Aufgrund der Expression von MCT8 in der humanen Blut-Hirn-Schranke, wird eine cerebrale Hypothyreose als Ursache der neurologischen Schäden angenommen (Roberts et al., 2008). MRT-Aufnahmen von Patienten mit MCT8-Defizienz zeigen eine verzögerte Myelinisierung und eine generelle Atrophie des Hirngewebes, die auf eine unzureichende Versorgung mit Schilddrüsenhormonen hinweist (Groeneweg et al., 2020). Hirngewebe von *Mct8/Oatp1cdko*-Mäusen und *Mct8/Dio2dko*-Mäusen – den derzeit präzisesten Mausmodellen in Bezug auf neurologische Studien – weist eine deutliche Reduktion des T₃-Gehalts auf (Bárez-López et al., 2019; Mayerl et al., 2014). Auch in adulten MCT8^{P253L}-Mäusen konnte eine signifikante Reduktion des T₃- und T₄-Gehalts im cerebralen Cortex nachgewiesen werden (Valcárcel-Hernández et al., 2022). Um Veränderungen der Genexpression in Hirngewebe von juvenilen MCT8^{P253L}-Mäusen zu untersuchen, wurde mRNA aus dem cerebralen Cortex von Versuchstieren an Postnataltag 21 isoliert und das Transkriptom mittels 3'-mRNA-Sequenzierung untersucht. Von besonderem Interesse waren dabei Gene, für die bereits eine Regulation durch den intrazellulären T₃-Spiegel nachgewiesen wurde (Morte et al., 2010, 2021). Diese Gene lassen sich anhand der Daten aus der 3'-mRNA-Sequenzierung in drei Gruppen einteilen: 1. T₃-positiv regulierte Gene mit Tendenz zur Reduktion in MCT8^{P253L}-Mäusen (Abbildung 10), 2. T₃-negativ regulierte Gene mit Tendenz zur Erhöhung in MCT8^{P253L}-Mäusen (Abbildung 11) und 3. T₃-regulierte Gene mit unveränderter Expression in MCT8^{P253L}-Mäusen (Abbildung 12).

Unter den T₃-positiv regulierten Genen, konnte eine signifikante Reduktion von *Arghap20* in NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen (**p*=0,023) und NaPB-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen (**p*=0,015) im Vergleich zu MCT8^{wt}-Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 10).

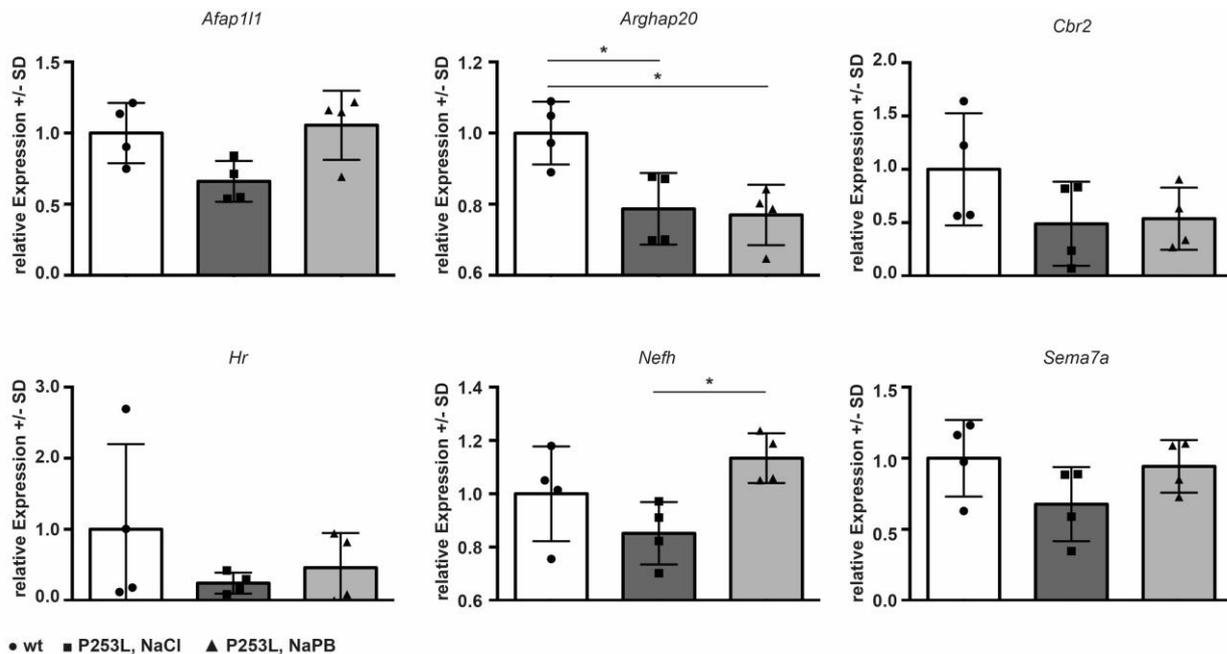


Abb. 10: T₃-positiv regulierte Gene mit verringerter Expression in Cortexgewebe MCT8^{P253L}-Mäusen

3'-mRNA-Sequenzierung von Cortexgewebe von Mäusen an Postnataltag 21. Der Mittelwert der Expression in MCT8^{wt}-Mäusen wurde als 1 definiert. Für die aufgeführten Gene zeigte sich eine Tendenz zur Reduktion der mRNA-Level in NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen verglichen mit MCT8^{wt}-Mäusen. Statistisch signifikant war dieser Unterschied nur für *Arghap20* (**p*=0,023). Die Expression von *Nefh* konnte in MCT8^{P253L}-Mäusen (**p*=0,038) durch Behandlung mit 200 mg/kgKG NaPB signifikant erhöht werden. Statistische Analyse: Einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Test für multiple Vergleiche. *p*-Wert: **p*<0,05

Auch die Expression von *Afap111* (*p*=0,099), *Cbr2* (*p*=0,245), *Hairless* (*p*=0,371), *Nefh* (*p*=0,310) und *Sema7a* (*p*=0,197) war in NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen gegenüber MCT8^{wt}-Mäusen reduziert, diese Unterschiede erreichten jedoch keine statistische Signifikanz (Abbildung 10). Die Expression von *Nefh* in NaPB-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen war signifikant höher als in NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen (**p*=0,035), abgesehen davon hatte NaPB keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der aufgeführten Gene.

Die Analyse von Genen, für die eine negative Regulation durch T_3 bekannt ist, lieferte eine signifikant erhöhte Expression von *Dgkg* ($*p=0,016$) und *Vwc2l* ($*p=0,028$) in NaCl-behandelten $MCT8^{P253L}$ -Mäusen, verglichen mit $MCT8^{wt}$ -Mäusen (Abbildung 11). Auch die Expression von *Dio2* ($p=0,088$) und *Sla* ($p=0,433$) war in NaCl-behandelten $MCT8^{P253L}$ -Mäusen leicht, aber nicht statistisch signifikant erhöht (Abbildung 11). Die erhöhte Expression von *Dgkg* in NaCl-behandelten $MCT8^{P253L}$ -Mäusen konnte durch Behandlung mit NaPB normalisiert werden ($*p=0,011$).

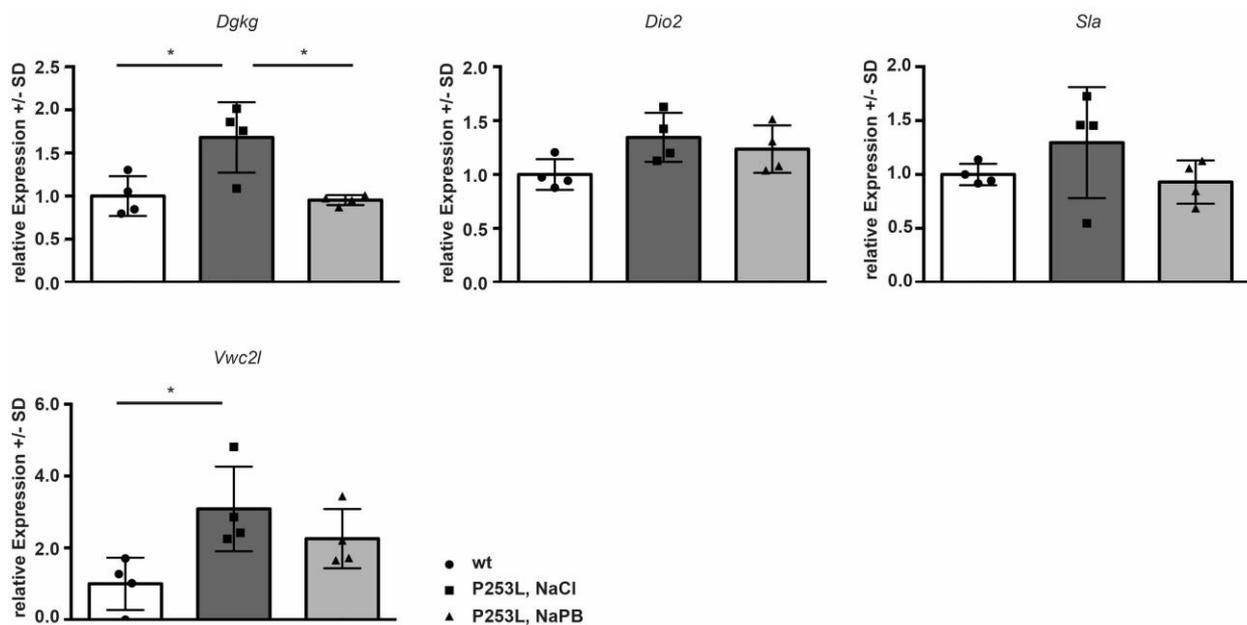


Abb. 11: T_3 -negativ regulierte Gene mit erhöhter Expression in Cortextgewebe $MCT8^{P253L}$ -Mäusen

3'-mRNA-Sequenzierung von Cortextgewebe Mäusen an Postnataltag 21. Der Mittelwert der Expression in $MCT8^{wt}$ -Mäusen wurde als 1 definiert. Für die aufgeführten Gene zeigte sich eine Tendenz zur Erhöhung der mRNA-Level in NaCl-behandelten $MCT8^{P253L}$ -Mäusen verglichen mit $MCT8^{wt}$ -Mäusen. Statistisch signifikant war dieser Unterschied für *Dgkg* ($*p=0,016$) und *Vwc2l* ($*p=0,027$). Die erhöhte Expression von *Dgkg* in $MCT8^{P253L}$ -Mäusen konnte durch Behandlung mit 200 mg/kgKG NaPB normalisiert werden ($*p=0,011$). Statistische Analyse: Einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Test für multiple Vergleiche. p -Wert: $*p<0,05$.

Anders als die anderen aufgeführten Gene, unterliegt die Expression der *Dio2* keiner direkten Regulation durch T_3 , kann aber dennoch als Marker für einen hypothyreoten Zustand im Gehirn genutzt werden (Bianco et al., 2002).

Die Gene *Hmgcs2*, *Itg7*, *Itih3*, *Luzp3* und *Rbm3* unterliegen ebenfalls einer positiven Regulation durch T_3 (Morte et al., 2010, 2021). Ihre Expression war in NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen und NaPB-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen gegenüber MCT8^{wt}-Mäusen unverändert (Abbildung 12).

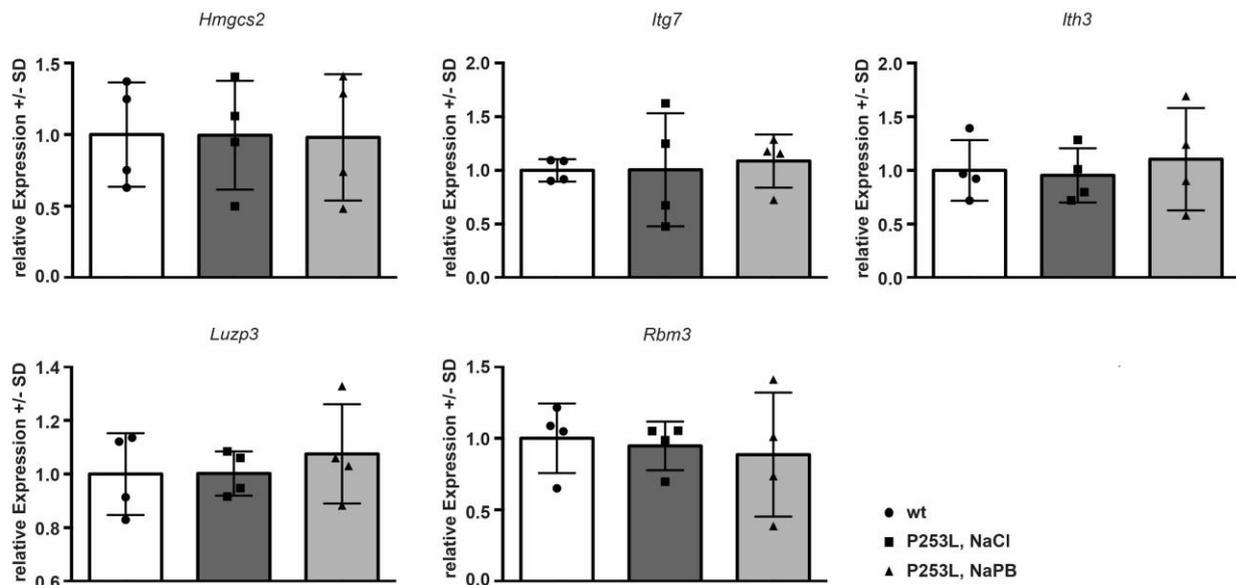


Abb. 12: T_3 -regulierte Gene mit unveränderter Expression in Cortexgewebe MCT8^{P253L}-Mäusen

3'-mRNA-Sequenzierung von Cortexgewebe aus Mäusen an Postnataltag 21. Der Mittelwert der Expression in MCT8^{wt}-Mäusen wurde als 1 definiert. Für die aufgeführten Gene ist eine positive Regulation der Expression durch den intrazellulären T_3 -Spiegel bekannt. Die Expression der untersuchten Gene in MCT8^{wt}-Mäusen, NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen und NaPB-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen war vergleichbar. Statistische Analyse: Einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Test für multiple Vergleiche. *p*-Wert: * $<0,05$.

3.7 Die Expression weiterer Schilddrüsenhormontransporter in Cortexgewebe von MCT8^{P253L}-Mäusen ist nicht verändert

Neben MCT8 stehen für die Aufnahme von Schilddrüsenhormonen weitere Transportproteine zur Verfügung (Groeneweg, Van Geest, et al., 2019). Wie unter 1.6 bereits beschrieben, verdeutlicht die Charakterisierung des *Mct8ko*- und des *Mct8/Oatp1c1dko*-Mausmodells die wichtige Rolle von OATP1C1 in der Blut-Hirn-Schranke von Mäusen. Um mögliche Veränderungen der Expression von OATP1C1 und weiteren Transportern mit Affinität für Schilddrüsenhormone im Gehirn von MCT8^{P253L}-Mäusen zu überprüfen, wurde die Expression von *Oatp1c1*, *Mct10*, *Lat1* und *Lat2* in Cortexgewebe von MCT8^{P253L}-Mäusen an

Postnataltag 21 durch 3'-mRNA-Sequenzierung untersucht. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen MCT8^{wt}-Mäusen, NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen und NaPB-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen nachweisen (Abbildung 13).

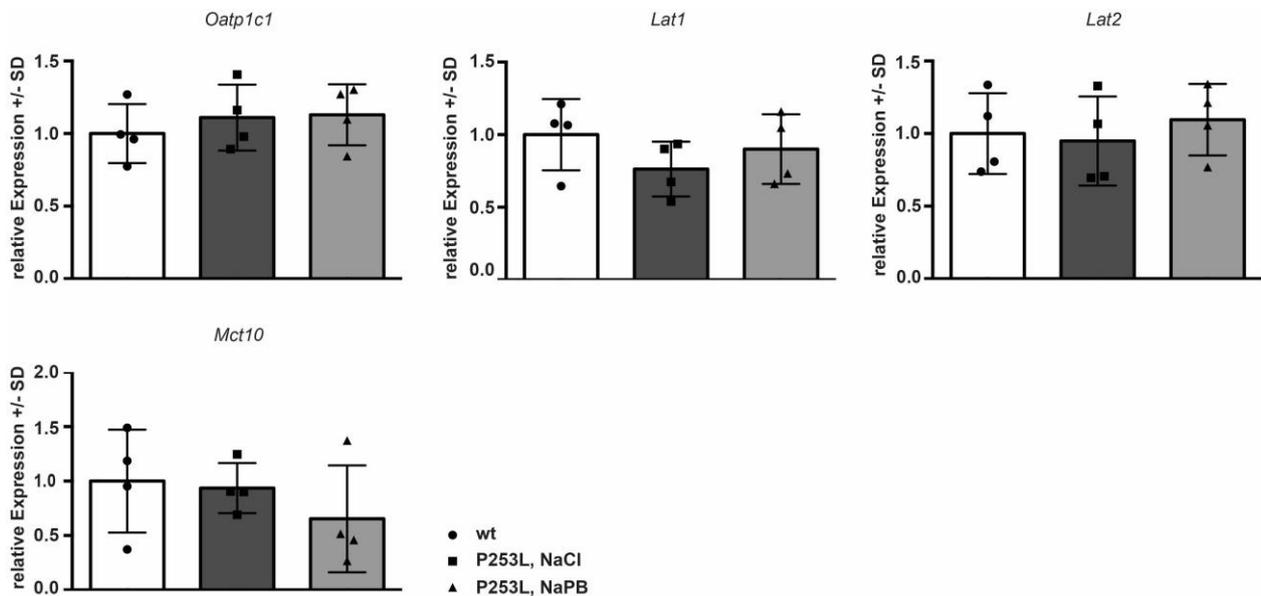


Abb. 13: Expression von Transportproteinen mit Affinität für Schilddrüsenhormone in Cortexgewebe von 21 Tage alten Mäusen

3'-mRNA-Sequenzierung von Cortexgewebe aus Mäusen an Postnataltag 21. Der Mittelwert der Expression in MCT8^{wt}-Mäusen wurde als 1 definiert. Die untersuchten Gene kodieren für Transportproteine mit Affinität für Schilddrüsenhormone. Die Expression der untersuchten Gene in MCT8^{wt}-Mäusen, NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen und NaPB-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen zeigte keinen signifikanten Unterschied. Statistische Analyse: Einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Test für multiple Vergleiche.

3.8 NaPB verbessert die Aufnahme von T₄ in primäre Astrozyten

Die Versorgung des Gehirns mit Schilddrüsenhormonen erfolgt durch die Aufnahme von T₃ und T₄ aus dem Blut. Das aufgenommene T₄ kann durch die Aktivität der DIO2 lokal zu T₃ konvertiert werden, wodurch eine ausreichende Versorgung des Gehirns mit T₃ sichergestellt wird (Schweizer & Köhrle, 2013). Insbesondere Astrozyten exprimieren das Enzym DIO2 und tragen dadurch wesentlich zur suffizienten Versorgung des Gehirns mit T₃ bei (Schweizer & Köhrle, 2013). Neben weiteren Transportern wie OATP1C1 und LAT2, ist auch MCT8 an der Aufnahme von Schilddrüsenhormonen in murine Astrozyten beteiligt (Braun et al., 2011). Als Modell für die Aufnahme von Schilddrüsenhormonen in Gliazellen wurden primäre Astrozyten aus MCT8^{P253L}-Mäusen und MCT8^{wt}-Mäusen

isoliert und kultiviert. Um das Potential von NaPB zur Verbesserung der Transportfunktion von MCT8 zu ermitteln, wurden die Zellen über 7 Tage mit 5 mM NaPB behandelt. Anschließend wurde die zelluläre T₃- und T₄-Aufnahme mit Hilfe radioaktiver Transportmessungen bestimmt. MCT8^{P253L}-Astrozyten zeigten im Vergleich zu MCT8^{wt}-Zellen eine deutlich reduzierte T₃-Aufnahme, die Aufnahme von T₄ war dagegen nur gering beeinträchtigt (Abbildung 14).

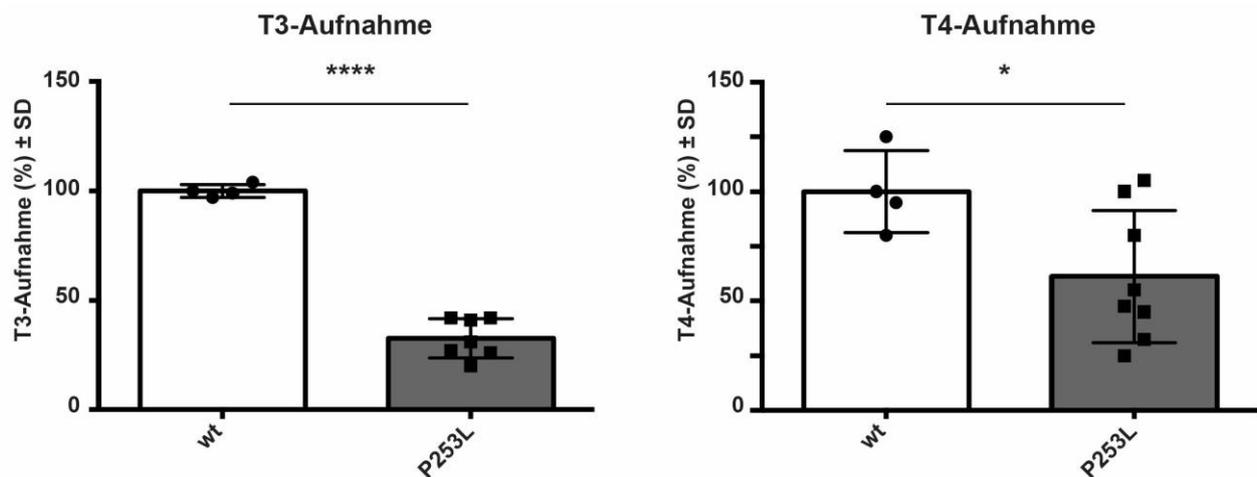


Abb. 14: T₃- und T₄-Aufnahme in primäre MCT8^{P253L}-Astrozyten

Primäre Astrozyten wurden aus MCT8^{wt}-Mäusen und MCT8^{P253L}-Mäusen isoliert. Die zelluläre Aufnahme von Schilddrüsenhormonen wurde mit Hilfe von ¹²⁵I-T₃ und ¹²⁵I-T₄ gemessen. MCT8^{P253L}-Astrozyten zeigen eine deutlich reduzierte Aufnahme von T₃ im Vergleich zu MCT8^{wt}-Zellen. Die Aufnahme von T₄ in MCT8^{P253L}-Astrozyten ist nur gering beeinträchtigt. n=4-8, die Daten wurden im Rahmen von drei unabhängigen Experimenten erhoben. Statistische Analyse: Ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur, *p*-Werte: *<0,05, **<0,01, ***<0,001, ****<0,0001.

In MCT8^{wt}-Zellen konnte die Aufnahme von T₃ durch die Behandlung mit NaPB signifikant gesteigert werden (Abbildung 15). Überraschenderweise hatte die Behandlung von MCT8^{P253L}-Zellen mit NaPB keinen Effekt auf die Aufnahme von T₃. Durch den Einsatz des MCT8-spezifischen Inhibitors Silychristin (SC) wird die MCT8-vermittelte Aufnahme von Schilddrüsenhormonen in Astrozyten unterbunden. Dadurch kann der Einfluss anderer Transportproteine wie OATP1C1 und LAT2 auf den Transport von T₃ und T₄ untersucht werden. Durch Zugabe von SC kam es sowohl in unbehandelten, als auch in NaPB-behandelten MCT8^{wt}-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der T₃-Aufnahme. Die

Aufnahme von T₃ in NaPB-behandelte MCT8^{wt}-Zellen war auch nach Einsatz von SC signifikant höher als in unbehandelten MCT8^{wt}-Zellen nach Zusatz von SC (Abbildung 15).

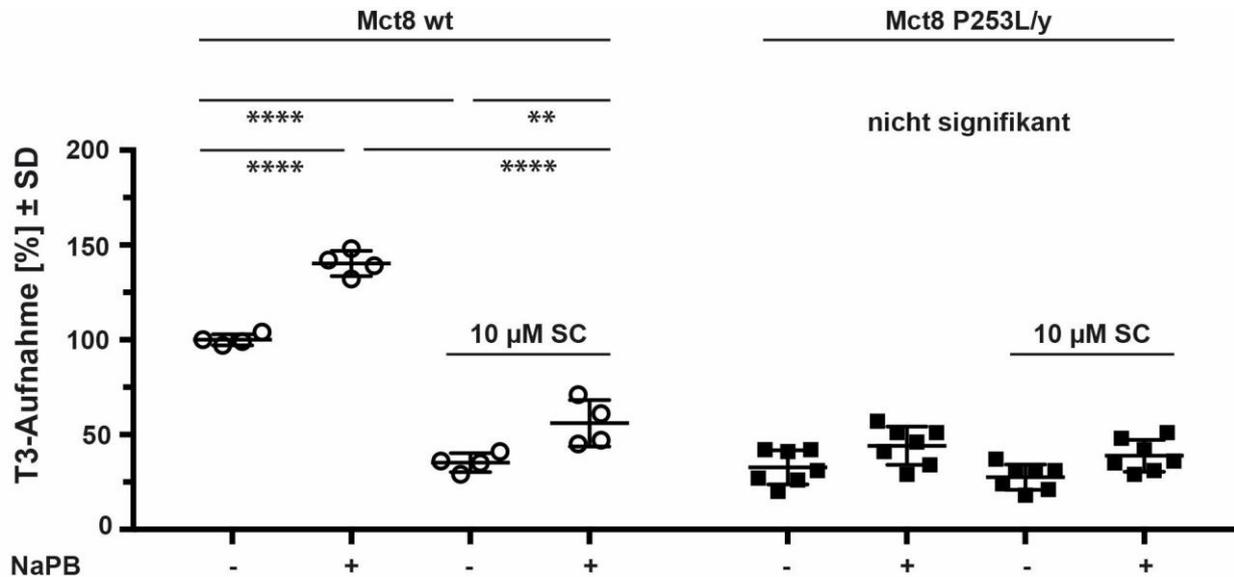


Abb. 15: Einfluss von NaPB auf die Aufnahme von ¹²⁵I-T₃ in primäre MCT8^{P253L}-Astrozyten

Primäre Astrozyten wurden aus MCT8^{wt}-Mäusen und MCT8^{P253L}-Mäusen isoliert. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen mit 5 mM NaPB behandelt. Die zelluläre Aufnahme von Schilddrüsenhormonen wurde mit Hilfe von ¹²⁵I-T₃ und ¹²⁵I-T₄ gemessen. 10 μM Silychristin (SC) wurde zur spezifischen Inhibition von MCT8 eingesetzt. In MCT8^{wt}-Zellen ließ sich die Aufnahme von T₃ durch Behandlung mit NaPB signifikant steigern. Dieser Effekt war unter Einsatz von SC deutlich, aber nicht vollständig reversibel. In MCT8^{P253L}-Zellen zeigte weder der Einsatz von NaPB, noch von SC einen signifikanten Effekt auf die T₃-Aufnahme. n=4-7, die Daten wurden im Rahmen von drei unabhängigen Experimenten erhoben. Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Korrektur für multiple Vergleiche. *p*-Werte: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001, **** < 0,0001.

Anders als die T₃-Aufnahme, ist die Aufnahme von T₄ in MCT8^{P253L}-Astrozyten im Vergleich zu MCT8^{wt}-Zellen nur gering beeinträchtigt (Abbildung 14). In beiden Zelllinien konnte die T₄-Aufnahme durch Behandlung mit NaPB signifikant gesteigert werden (Abbildung 16). Durch Inkubation mit SC wurde die Aufnahme von T₄ in unbehandelte MCT8^{wt}-Zellen und MCT8^{P253L}-Zellen leicht, aber nicht signifikant reduziert. Inkubation von NaPB-behandelten MCT8^{wt}-Zellen und MCT8^{P253L}-Zellen mit SC hatte eine signifikante Abnahme der T₄-Aufnahme zur Folge. In NaPB-behandelten MCT8^{P253L}-Zellen war

die Aufnahme von T₄ auch nach Inkubation mit SC noch signifikant höher als in unbehandelten MCT8^{P253L}-Zellen nach Zusatz von SC (Abbildung 16).

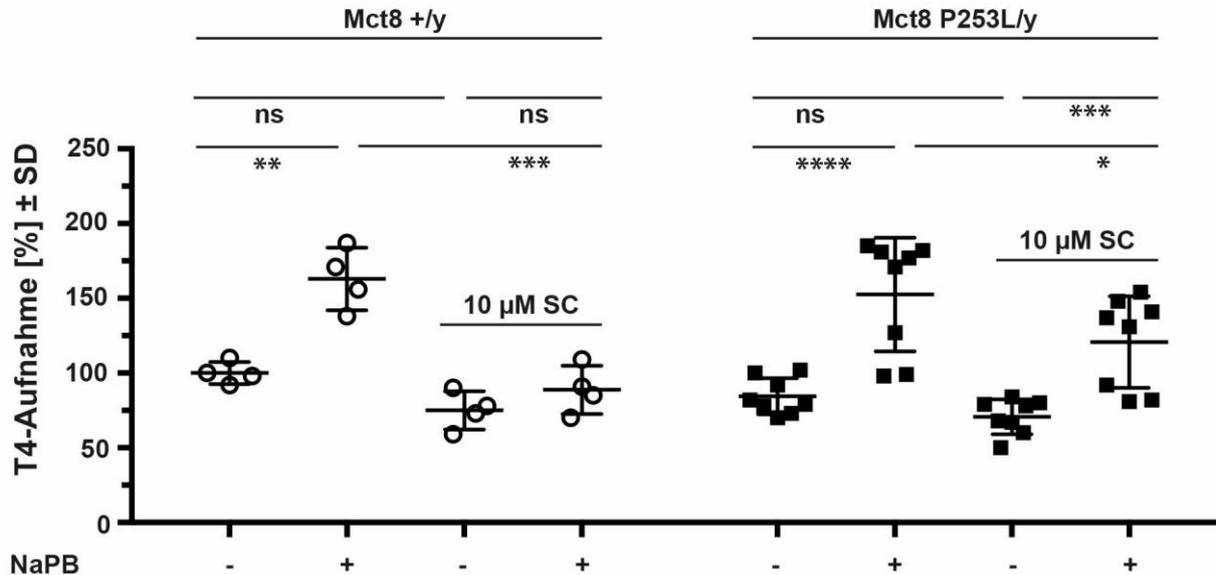


Abb. 16: Einfluss von NaPB auf die Aufnahme von ¹²⁵I-T₄ in primäre MCT8^{P253L}-Astrozyten

Primäre Astrozyten wurden aus MCT8^{wt}-Mäusen und MCT8^{P253L}-Mäusen isoliert. Die Zellen wurden mit 5 mM NaPB über 7 Tage behandelt. Die zelluläre Aufnahme von Schilddrüsenhormonen wurde mit Hilfe von ¹²⁵I-T₃ und ¹²⁵I-T₄ gemessen. 10 μM Silychristin (SC) wurde zur spezifischen Inhibition von MCT8 eingesetzt. Die T₄-Aufnahme ließ sich in beiden Zelllinien durch Behandlung mit NaPB signifikant steigern. In MCT8^{wt}-Zellen war dieser Effekt nach Zugabe von SC nahezu vollständig reversibel. NaPB-behandelte MCT8^{P253L}-Zellen zeigten auch nach Zusatz von SC eine signifikant höhere T₄-Aufnahme im Vergleich zu unbehandelten MCT8^{P253L}-Zellen nach Inkubation mit SC. n=4-8, die Daten wurden im Rahmen von drei unabhängigen Experimenten erhoben. Statistische Analyse: Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Korrektur für multiple Vergleiche. *p*-Werte: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001, **** < 0,0001.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, das Potential von NaPB zur Behandlung der MCT8-Defizienz am Beispiel von MCT8^{P252L}-Mäusen als Modell für einen komplexen Organismus zu untersuchen. NaPB verbessert in Zellmodellen die Expression und Transportfähigkeit der pathogenen MCT8-Varianten delF501, S194F, S290F, L434W, R445C, L492P und L568P (Braun & Schweizer, 2015, 2017). Auch in MCT8^{P321L}-iBMECs als Modell für die humane Blut-Hirn-Schranke, konnte NaPB die Funktion von MCT8^{P321L} wiederherstellen (Braun et al., 2022). Ein erster, experimenteller klinischer Einsatz von GPB in Zwillingen, die von der pathogenen Variante MCT8^{P231L} betroffen sind, führte zu einer Verbesserung der peripheren Hyperthyreose und hatte einen geringen Einfluss auf die neurologischen Beeinträchtigungen der Brüder (Zung et al., 2024). Die korrespondierende murine Mutation zur humanen pathogenen Variante P321L, ist MCT8^{P253L}. Auf Grundlage der bisherigen Forschungsergebnisse überprüfte ich im Rahmen meiner Dissertation die Hypothese, dass NaPB die Expression und Funktion von MCT8^{P253L} im Mausmodell verbessern kann. Ein weiteres Ziel war die Charakterisierung von juvenilen MCT8^{P253L}-Mäusen, die mit NaPB behandelt worden waren.

4.1 Unauffällige körperliche Entwicklung von MCT8^{P253L}-Mäusen

Patienten mit MCT8-Defizienz fallen neben den neurologischen Defiziten durch eine verzögerte körperliche Entwicklung auf. Die Kinder haben häufig Probleme bei der Nahrungsaufnahme, sind untergewichtig und bleiben im Wachstum hinter gleichaltrigen Kindern zurück. Untergewicht ist ein wichtiger prognostischer Parameter, der mit einer erhöhten Sterblichkeit korreliert (Groeneweg et al., 2020). Mit einem Gewicht unterhalb der 1. Perzentile im Alter von 6 Monaten, waren auch die von der Mutation P321L betroffenen Zwillinge deutlich untergewichtig (Verge et al., 2012). Im Kontrast dazu zeigen MCT8^{P253L}-Mäuse keine äußerlichen Auffälligkeiten und waren hinsichtlich Größe und Gewicht nicht von ihren gesunden Wurfgeschwistern zu unterscheiden (Abbildung 5). Auch *Mct8*ko-Mäuse zeigen eine unauffällige körperliche Entwicklung (Trajkovic et al., 2007). Das Untergewicht von Patienten mit MCT8-Defizienz lässt sich zum einen durch einen gesteigerten Grundumsatz auf Grund der hohen T₃ Spiegel im Blut erklären. Zum anderen leiden die Kinder häufig an einer Dysphagie, die die Nahrungsaufnahme erschwert und in

schweren Fällen die Administration einer gastralen Sonde notwendig macht (Groeneweg et al., 2020). *Mct8*ko-Mäuse bilden zwar gut die hyperthyreote Stoffwechsellage im Blut und peripheren Organen wie Leber, Niere und Muskulatur MCT8-defizienter Patienten ab, zeigen allerdings kaum neurologische Auffälligkeiten (Dumitrescu et al., 2006; Trajkovic et al., 2007; Wirth et al., 2009). Zum jetzigen Zeitpunkt stellen *Mct8/Oatp1c1dko* und *Mct8/Dio2dko* die präzisesten Mausmodelle im Hinblick auf das Krankheitsbild der MCT8-Defizienz dar. In *Mct8/Oatp1c1dko*-Mäusen konnte bereits ab Postnataltag 17 eine Reduktion des Körpergewichts im Vergleich zu ihren gesunden Wurfgeschwistern beobachtet werden (Mayerl et al., 2014). Auch *Mct8/Dio2dko*-Mäuse zeigten im Vergleich zum Wildtyp im Alter von sechs Monaten ein reduziertes Gewicht (Bárez-López et al., 2019). In *Mct8/Oatp1c1dko*-Mäusen konnte eine Dysregulation der somatotropen Achse mit reduzierter Expression von *growth hormone releasing hormone (Ghrh)* im Hypothalamus, *growth hormone (Gh)* in der Hypophyse und *insulin-like growth factor 1 (Igf1)* in der Leber nachgewiesen werden (Mayerl et al., 2014). Eine mögliche Erklärung für das reduzierte Gewicht von *Mct8/Oatp1c1dko*- und *Mct8/Dio2dko*-Mäusen ist eine zentrale Dysregulation der Wachstumshormonachse durch den hypothyreoten Zustand des ZNS. *Mct8*ko-Mäuse zeigen keine Veränderung der Expression von *Gh* und weiteren T₃-regulierten Genen in der Hypophyse (Trajkovic et al., 2007). Eine mögliche Erklärung für die normale körperliche Entwicklung von *Mct8*ko- und MCT8^{P253L}-Mäusen ist die Kompensation der cerebralen Hypothyreose durch die Expression von OATP1C1 und DIO2.

4.2 Die Mutation P253L beeinträchtigt die Expression von MCT8 in Abhängigkeit vom zellulären Kontext

Die Expression von MCT8 in MCT8^{P321L}-überexprimierenden MDCK1-Zellen ist im Vergleich zu MCT8^{wt}-Zellen reduziert (Abbildung 4)(Zung et al., 2024). Auf Grundlage dieser Beobachtungen prüfte ich die Hypothese, dass die Expression der murinen Variante P253L in Gewebeproben von MCT8^{P253L}-Mäusen ebenfalls verringert ist. Der Nachweis der MCT8-Expression im Gehirn wäre mit Blick auf die neurologischen Symptome der Patienten von besonderem Interesse, gelingt allerdings mit dem aktuell verfügbaren Antikörper nicht. Die Detektion von MCT8 in Nierengewebe von MCT8^{P253L}-Mäusen zeigte der Hypothese entsprechende Ergebnisse; die Expression von MCT8 in Nierengewebe von MCT8^{P253L}-Mäusen war in allen Versuchsgruppen im Vergleich zu *Mct8*^{wt}-Mäusen

signifikant reduziert (Abbildung 7). Unerwartet war dagegen das Ergebnis der Analyse von Lebergewebe. Hier ließ sich keine Reduktion der MCT8-Expression in MCT8^{P253L}-Mäusen nachweisen (Abbildung 7). Versuche in Zellkultur haben bereits gezeigt, dass die Expression und Funktion der pathogenen Variante MCT8^{P321L} je nach untersuchtem Zellmodell variiert. Während die Expression von MCT8^{P321L} in COS-1, JEG3 und Flp-in-293-Zellen erhalten ist, konnte in iBMECS und MDCK1-Zellen eine reduzierte Expression des Transporters nachgewiesen werden (Abbildung 4)(Braun et al., 2022; Kinne et al., 2009). Untersuchungen an iBMECs bieten den Vorteil eines humanen Zellmodells, das direkt von betroffenen Patienten stammt. In diesen Zellen wird MCT8 durch einen endogenen Promoter reguliert, was das Modell physiologisch relevanter für die Erforschung der Pathophysiologie von Mutationen in MCT8 macht. Die hier im Tier beobachtete Bestätigung des Effektes ist dennoch wichtig für die Interpretation der Pathophysiologie – auch beim Patienten.

Eine mögliche Hypothese zur Erklärung der verminderten MCT8-Expression in der Niere beruht auf Beeinträchtigungen der Proteinfaltung von MCT8^{P253L}, die sich abhängig vom zellulären Kontext in einer verminderten Stabilität und Expression des Transporters manifestieren. *In silico* Proteinstrukturvorhersageanalysen der humanen Variante MCT8^{P321L} prognostizieren veränderte Interaktionen zwischen den Transmembranhelices des Transporters, die dessen gesamte Struktur beeinflussen (Valcárcel-Hernández et al., 2022). Die Mutation P321L führt zu einem vollständigen Funktionsverlust des Proteins und einer gestörten Mobilität von MCT8^{P321L} in der Plasmamembran (Kersseboom et al., 2013). In iBMECs und MDCK1-Zellen konnten Expression und Transportfunktion von MCT8^{P321L} durch den Einsatz des chemischen Chaperons NaPB wiederhergestellt werden, was die Hypothese der gestörten Proteinfaltung unterstützt (Abbildung 4)(Braun et al., 2022). In MCT8^{P321L}-iBMECs konnte zudem eine erhöhte Expression der endogenen Chaperone Calreticulin, GRP94 und HSP47 nachgewiesen werden, die möglicherweise eine zelluläre Reaktion auf fehlgefaltete MCT8^{P321L}-Moleküle darstellt (Doreen Braun, unpublizierte Daten). In Zellmodellen konnte eine Beteiligung des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) am Abbau von MCT8 nachgewiesen werden (Zwanziger et al., 2016). Als stark sekretorisches Organ verfügt die Leber möglicherweise über höhere Kapazitäten zur Kompensation von ER-Stress. Durch eine verstärkte Expression endogener Chaperone, könnten instabile MCT8-Moleküle stabilisiert werden und zu einer höheren Expression des Transporters an

der Plasmamembran beitragen. Um die Ursachen der zelltypabhängigen Expression von MCT8 abschließend zu klären sind weitere Versuche notwendig. Um eine Beteiligung des Unfolded Protein Response (UPR) zu untersuchen, kann die Expression endogener Chaperone wie Calreticulin, GRP94 und HSP47 in verschiedenen Geweben bestimmt werden. Die Relevanz des UPS kann durch den Einsatz von Proteasom-Inhibitoren wie Lactacystin oder MG132 überprüft werden (Braun & Schweizer, 2015; Zwanziger et al., 2016).

4.3 Periphere Hyperthyreose in juvenilen MCT8^{P253L}-Mäusen

Neben den auffälligen körperlichen Symptomen zeigen Patienten mit MCT8-Defizienz charakteristische laborchemische Veränderungen. Typisch ist eine deutliche Erhöhung der Serum T₃-Spiegel, bei gleichzeitig erniedrigtem T₄ und normwertigem bis leicht erhöhtem TSH. Resultat ist ein pathologisch erhöhter T₃/T₄-Quotient (Groeneweg et al., 2020). *Mct8ko*-Mäuse zeigen die gleichen Veränderungen der Serumparmeter (Dumitrescu et al., 2006; Trajkovic et al., 2007) und eignen sich daher gut als Modell zur Untersuchung der Auswirkungen der MCT8-Defizienz auf periphere Organe. Auf Grundlage des bisherigen Forschungsstandes prüfte ich die Hypothese, dass auch MCT8^{P253L}-Mäuse die für MCT8-Defizienz typischen Veränderungen der Serumhormonspiegel präsentieren und sich periphere Organe wie Leber und Niere dadurch in einer hyperthyreoten Stoffwechsellage befinden. In Nierengewebe von juvenilen MCT8^{P253L}-Mäusen konnte - der Hypothese entsprechend - in allen Versuchsgruppen eine signifikant erhöhte Enzymaktivität der DIO1 nachgewiesen werden (Abbildung 8). In der Versuchsgruppe P21 waren auch die mRNA-Level des Enzyms erhöht (Abbildung 8). Da die Expression der DIO1 einer positiven Regulation durch T₃ unterliegt, kann das Enzym als Marker für eine hyperthyreote Stoffwechsellage genutzt werden (Gereben et al., 2008). Diese Daten sind ähnlich den Ergebnissen aus *Mct8ko*-Mäusen. Auch in Nierengewebe von *Mct8ko*-Mäusen konnte anhand einer erhöhten Expression und Aktivität der DIO1 eine Hyperthyreose nachgewiesen werden (Trajkovic-Arsic et al., 2010).

In Lebergewebe von *Mct8ko*-Mäusen ließen sich ebenfalls eine erhöhte Expression und Aktivität der DIO1 nachweisen (Trajkovic et al., 2007). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Aufnahme von T₃ in Lebergewebe von *Mct8ko*-Mäusen nicht beeinträchtigt ist und entsprechend der Serumkonzentration von T₃ erfolgt (Dumitrescu et al., 2006). Diese

Tatsache wird auf die Expression einer großen Bandbreite von Schilddrüsenhormontransportern in Lebergewebe zurückgeführt. Zu diesen - mehr oder weniger spezifischen - Transportern gehören unter anderem Slc17a4, Natriumtaurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp) und Mitglieder der Oatp Familie (Groeneweg, Van Geest, et al., 2019). Untersuchungen während der perinatalen Entwicklung von *Mct8ko*-Mäusen, konnten anhand erhöhter Schilddrüsenhormonspiegel und einer erhöhten Expression T_3 -abhängiger Gene nachweisen, dass sich Lebergewebe bereits am Tag der Geburt in einem hyperthyreoten Zustand befindet (Ferrara et al., 2013). Auch in Lebergewebe von adulten $MCT8^{P253L}$ -Mäusen konnten erhöhte T_3 -Werte und erniedrigte T_4 -Werte nachgewiesen werden (Valcárcel-Hernández et al., 2022). Überraschenderweise war die Aktivität der DIO1 in Lebergewebe von juvenilen $MCT8^{P253L}$ -Mäusen in diesem Versuch nicht erhöht (Abbildung 9). Die hier gezeigten Daten zur Enzymaktivität der DIO1 in Lebergewebe stehen weder im Einklang mit den Beobachtungen in Nierengewebe von juvenilen $MCT8^{P253L}$ -Mäusen, noch mit der aufgeführten Literatur. Die Ergebnisse stammen aus Versuchen, bei denen zur Ermittlung der Enzymaktivität 40 μ g Protein eingesetzt wurden. Bei später in der Arbeitsgruppe durchgeführten Experimenten stellte sich heraus, dass für den durchgeführten Assay deutlich geringere Proteinmengen (3 μ g) nötig sind. Unter den geänderten Versuchsbedingungen konnte auch in Lebergewebe von $MCT8^{P253L}$ -Mäusen eine erhöhte Aktivität der DIO1 und damit eine hyperthyreote Stoffwechsellage nachgewiesen werden (Abbildung 17, beispielhaft). Wie in Nierengewebe, ließen sich auch in Lebergewebe von $MCT8^{P253L}$ -Mäusen an Postnataltag 21 erhöhte *Dio1*-mRNA-Level nachweisen (Abbildung 9).

Die für *MCT8*-Defizienz charakteristische Konstellation aus erhöhtem Serum- T_3 -Spiegel bei gleichzeitig erniedrigtem T_4 , konnte auch bei der Bestimmung der Schilddrüsenhormone im Serum adulter $MCT8^{P253L}$ -Mäuse nachgewiesen werden (Valcárcel-Hernández et al., 2022). Anders als in adulten $MCT8^{P253L}$ - und *Mct8ko*-Mäusen war die direkte Bestimmung der Hormonwerte im Serum von juvenilen $MCT8^{P253L}$ -Mäusen auf Grund der geringen Blutmenge nicht möglich. Anhand der erhöhten DIO1-Aktivität und Expression in Nieren- und Lebergewebe der Versuchstiere können jedoch indirekt Rückschlüsse auf erhöhte T_3 -Werte im Blut der Versuchstiere gezogen werden. Die Ursache der pathologischen Schilddrüsenhormonspiegel von Patienten mit *MCT8*-Defizienz, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt. Da eine zusätzliche Inaktivierung der DIO1 in

*Mct8*ko-Mäusen (*Mct8/Dio1*dko-Mausmodell) zur Normalisierung der Serumhormonspiegel führt, wird das Enzym als ursächlich für den pathologischen T₃/T₄ Quotienten angenommen (Liao et al., 2011).

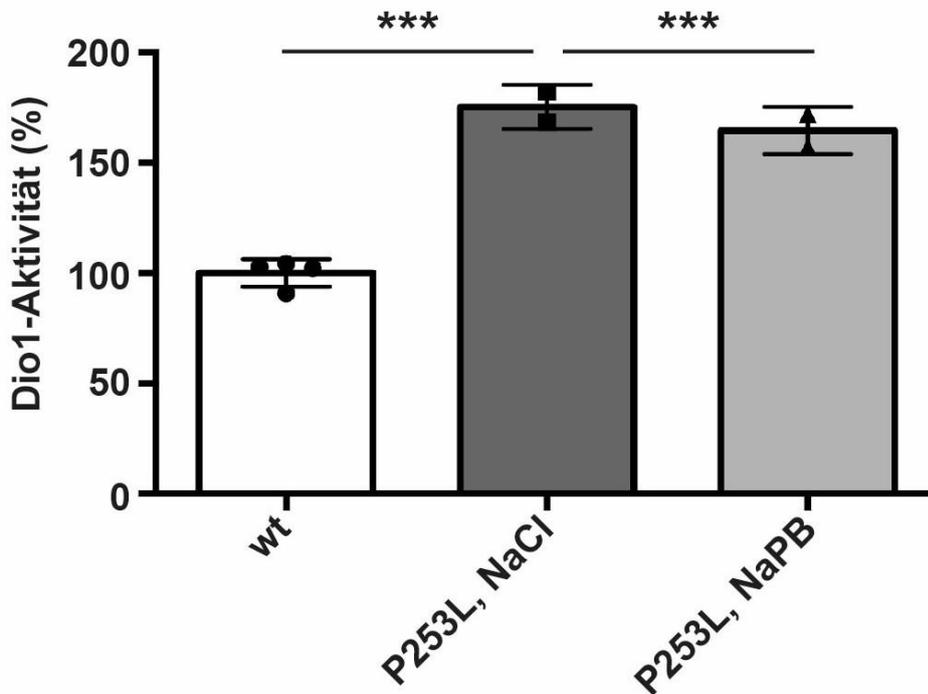


Abb. 17: DIO1-Aktivität in Lebergewebe von P21 MCT8^{P253L}-Mäusen

Nachweis der DIO1-Aktivität in Lebergewebe durch einen radioaktiven Enzymassay. Es wurden 3 µg Gesamtprotein eingesetzt. Die Aktivität der DIO1 in NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen und NaPB-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen ist gegenüber MCT8^{wt}-Mäusen erhöht. Statistische Analyse: Einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Test für multiple Vergleiche. *p*-Werte: **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001, *****p*<0,0001. Diese Daten wurden mir von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

Eine selektive Inaktivierung der DIO1 in Hepatozyten (*Alb-Cre ; Trsp^{fl/fl} ; Mct8^{ko}*) hat keinen Einfluss auf die Bluthormonspiegel (Wirth et al., 2015). Die Leber spiegelt also die hohen T₃-Spiegel im Blut wider, scheint aber offenbar nicht die Ursache für diese zu sein. Überraschenderweise konnte in Nierengewebe von *Mct8*ko-Mäusen trotz erniedrigter Serum-T₄-Spiegel, neben einem erhöhten T₃-Gehalt auch ein erhöhter Gehalt von T₄ nachgewiesen werden (Trajkovic-Arsic et al., 2010). Nach peripherer Injektion von radioaktiv markiertem T₃ und T₄, konnte eine verstärkte Akkumulation beider Hormone in Nierengewebe beobachtet werden (Trajkovic-Arsic et al., 2010). Bei gleichzeitig verstärkter Expression

der DIO1 erfolgt eine erhöhte Konversion von T₄ zu T₃. Auf Grundlage dieser Beobachtungen wird diskutiert, ob die Niere möglicherweise zur Entstehung des pathologischen T₃/T₄ Quotienten beiträgt (Trajkovic-Arsic et al., 2010).

4.4 Cortexgewebe von juvenilen MCT8^{P253L}-Mäusen zeigt Anzeichen einer cerebralen Hypothyreose

Auf Grund der schweren neurologischen Beeinträchtigungen von Patienten mit MCT8-Defizienz, sind Veränderungen im Gehirn von MCT8-defizienten Mausmodellen von besonderem Interesse. Das *Mct8/Oatp1c1dko*-Mausmodell und das *Mct8/Dio2dko*-Mausmodell zeigen, dass insbesondere die Aufnahme und Konversion von T₄ zu T₃, für die Versorgung des Gehirns mit Schilddrüsenhormonen in Abwesenheit von MCT8 eine wichtige Rolle spielen (Bárez-López et al., 2019; Mayerl et al., 2014). Als indirekter Parameter für den T₃-Spiegel im Gehirn, kann die Expression T₃-regulierter Gene genutzt werden. Der Vergleich von Cortexgewebe NaCl-behandelter MCT8^{P253L}-Mäuse und MCT8^{wt}-Mäuse an Postnataltag 21 lieferte eine signifikant veränderte Expression der Gene *Arhgap20*, *Dgkg* und *Vwc2l*, die auf einen hypothyreoten Zustand im Hirn von juvenilen MCT8^{P253L}-Mäusen hindeutet (Abbildung 10, Abbildung 11). *Dgkg* unterliegt einer negativen Regulation durch T₃ (Morte et al., 2010) und ist in MCT8^{P253L}-Mäusen signifikant erhöht (Abbildung 11). Das Gen kodiert für eine Diacylglycerol-Kinase, die durch Regulation der Proteinkinase C gamma vermutlich indirekt an der Differenzierung von Purkinje-Zellen im Kleinhirn beteiligt ist (Gene Cards, 2024). *Vwc2l*, ein Gen das für das Von Willebrand Factor C Domain-Containing Protein 2-Like kodiert und vermutlich an der Differenzierung von Neuronen beteiligt ist, wird ebenfalls negativ durch T₃ reguliert (Alliance of Genome Resources, 2024). *Arhgap20* unterliegt einer positiven Regulation durch T₃, die Funktion dieses Gens ist bisher noch unbekannt (Morte et al., 2021). In *Mct8ko*-Mäusen konnte eine Reduktion des T₃- und T₄-Gehalts in Hirngewebe nachgewiesen werden (Mayerl et al., 2014; Trajkovic et al., 2007). Die differenziertere Analyse von Cortexgewebe aus *Mct8ko*-Mäusen ergab einen reduzierten T₃-, bei unverändertem T₄-Gehalt und eine veränderte Expression der Gene *Cbr2*, *Hr* und *Dgkg* (Bárez-López et al., 2019; Morte et al., 2010; Valcárcel-Hernández et al., 2022). Überraschenderweise konnte in adulten MCT8^{P253L}-Mäusen neben der Reduktion des T₃-Gehalts auch ein reduzierter T₄-Gehalt im cerebralen Cortex nachgewiesen werden (Valcárcel-Hernández et al., 2022). Trotz des

hypothyreoten Zustands von Cortexgewebe adulter MCT8^{P253L}-Mäuse, ließ sich keine signifikante Änderung der Genexpression von *Cbr2*, *Cntn2*, *Hr*, *Dio3*, *Nefm*, *Dio2*, *Flywch2* und *Mbp* nachweisen (Valcárcel-Hernández et al., 2022). Im Gegensatz zu *Mct8ko*-Mäusen, deren Gehirn nur geringe Veränderungen auf histologischer Ebene zeigt, konnten in adulten MCT8^{P253L}-Mäusen Veränderungen der cortikalen Neuroarchitektur nachgewiesen werden, die auf eine verminderte Myelinisierung hindeuten (Valcárcel-Hernández et al., 2022). Das GABAergen-System in Hirngewebe von MCT8^{P253L}-Mäusen zeigt Beeinträchtigungen, die mit den Beobachtungen in *Mct8/Oatp1c1dko*-Mäusen und *Mct8/Dio2dko*-Mäusen vergleichbar sind (Valcárcel-Hernández et al., 2022). Im Kontrast zu *Mct8ko*-Mäusen, die phänotypisch keine offensichtlichen neurologischen Einschränkungen zeigen, konnte in adulten MCT8^{P253L}-Mäusen eine Reduktion der Muskelkraft, Beeinträchtigung der Koordination und ein ängstliches Verhalten beobachtet werden (Valcárcel-Hernández et al., 2022). Damit stellen MCT8^{P253L}-Mäuse ein gutes Modell zur Untersuchung der Pathomechanismen der MCT8-Defizienz dar, insbesondere auch im Hinblick auf die neurologischen Veränderungen. Gegenüber *Mct8/Oatp1c1dko*-Mäusen und *Mct8/Dio2dko*-Mäusen, bietet das MCT8^{P253L}-Mausmodell den Vorteil, dass dazu kein Eingriff in ein weiteres Gen notwendig ist.

Um die Auswirkungen von Mutationen in MCT8 auf die Versorgung des murinen Gehirns mit Schilddrüsenhormonen besser zu verstehen, sind weitere Schilddrüsenhormontransporter wie OATP1C1, die für den Funktionsverlust von MCT8 kompensieren können, von besonderem Interesse. Die Analyse von Cortexgewebe aus MCT8^{P253L}-Mäusen an Postnataltag 21 ergab keine signifikanten Veränderungen der Expression von *Oatp1c1*, *Mct10*, *Lat1* und *Lat2* (Abbildung 13). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Untersuchungen an adulten MCT8^{P253L}-Mäusen (Valcárcel-Hernández et al., 2022). In *Mct8ko*-Mäusen konnte dagegen eine erhöhte Expression von *Oatp1c1* und *Lat2* im Vergleich zu MCT8^{wt}-Mäusen und eine erhöhte Expression von *Oatp1c1* und *Lat1* im Vergleich zu MCT8^{P253L}-Mäusen nachgewiesen werden (Valcárcel-Hernández et al., 2022). Der reduzierte T₄-Gehalt in Cortexgewebe von adulten MCT8^{P253L}-Mäusen kann also möglicherweise auf die Abwesenheit einer verstärkten Expression von *Oatp1c1* und *Lat2* zurückgeführt werden. Allerdings zeigte LAT2 in COS1-Zellen nur eine geringe Transportaktivität für T₄ (Zevenbergen et al., 2015). Ob die Transporteigenschaften der murinen Variante sich von humanem LAT2 unterscheiden, wurde bisher nicht untersucht.

4.5 Expression und Transportaktivität von MCT8^{P253L} in primären Astrozyten

Als Modell für die Aufnahme von Schilddrüsenhormonen in Gliazellen wurden primäre Astrozyten aus MCT8^{P253L}-Mäusen und MCT8^{wt}-Mäusen isoliert und kultiviert. Basierend auf den Ergebnissen aus MCT8^{P321L}-überexprimierenden MDCK1-Zellen (Abbildung 4) und MCT8^{P321L}-iBMECs, überprüfte ich die Hypothese, dass die Aufnahme von T₃ und T₄ in MCT8^{P253L}-Astrozyten reduziert ist und sich durch Einsatz von NaPB verbessern lässt. In Einklang mit dieser Hypothese, war die Aufnahme von T₃ in MCT8^{P253L}-Astrozyten im Vergleich zu MCT8^{wt}-Astrozyten signifikant verringert (Abbildung 14). Die Inkubation von MCT8^{wt}-Astrozyten mit dem MCT8-spezifischen Inhibitor SC führte zu einer deutlichen Reduktion der T₃-Aufnahme, was darauf hindeutet, dass MCT8 wesentlich an der Aufnahme von T₃ in murine Astrozyten beteiligt ist. Die stark reduzierte Aufnahme von T₃ in MCT8^{P253L}-Astrozyten ließ sich durch Inkubation mit SC nicht weiter senken. Diese Beobachtung spricht für einen kompletten Funktionsverlust von MCT8^{P253L} in Astrozyten und steht im Einklang mit Ergebnissen aus anderen Zellmodellen (Kerseboom et al., 2013).

4.5.1 NaPB verbessert die Aufnahme von T₃ in MCT8^{wt}-Astrozyten

In MCT8^{wt}-Astrozyten konnte die Aufnahme von T₃ durch Behandlung mit NaPB signifikant gesteigert werden (Abbildung 15). Dieser Effekt war unter Einsatz von SC größtenteils reversibel, was darauf hindeutet, dass die gesteigerte Aufnahme von T₃ im Wesentlichen durch MCT8 vermittelt wird. Überraschenderweise konnte die T₃-Aufnahme in MCT8^{P253L}-Astrozyten, anders als in MCT8^{wt}-Astrozyten, MDCK1-Zellen und iBMECs durch Behandlung mit NaPB nicht verbessert werden (Abbildung 4, Abbildung 15) (Braun et al., 2022). Die Ursache für diese Beobachtung ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar. Eine mögliche Erklärung für die gesteigerte T₃-Aufnahme in MCT8^{wt}-Astrozyten ist, dass NaPB MCT8 durch seine Wirkung als chemisches Chaperon stabilisiert und dadurch eine erhöhte Expression des Transporters an der Plasmamembran fördert. Die Aufnahme von T₃ in NaPB-behandelte MCT8^{wt}-Astrozyten war nach Inkubation mit SC deutlich reduziert, aber immer noch signifikant höher als in unbehandelten MCT8^{wt}-Astrozyten, was für einen zusätzlichen Effekt auf weitere Transportproteine spricht. In MCT8^{P321L}-iBMECs konnte eine Beteiligung von MCT10 an der verbesserten T₃-Aufnahme durch NaPB nachgewiesen werden (Braun et al., 2022). Um den genauen Mechanismus der gesteigerten T₃-

Aufnahme durch NaPB in MCT8^{wt}-Astrozyten zu klären, sind weitere Experimente wie der Nachweis der MCT8-Expression mittels Western Blot notwendig. Zukünftige Experimente könnten durch den Einsatz kompetitiver Inhibitoren wie Phenylalanin und Tryptophan untersuchen, ob MCT10 auch an der T₃-Aufnahme in Astrozyten beteiligt ist (Braun et al., 2022).

4.5.2 MCT8 spielt eine untergeordnete Rolle für die Aufnahme von T₄ in murine Astrozyten
 Interessanterweise zeigten MCT8^{P253L}-Astrozyten im Vergleich zu MCT8^{wt}-Astrozyten nur eine geringfügig reduzierte Aufnahme von T₄ (Abbildung 14). Die Inkubation mit dem MCT8-spezifischen Inhibitor SC, hatte in beiden Zelllinien keine signifikante Reduktion der T₄-Aufnahme zur Folge. Diese Beobachtungen stellen die Relevanz von MCT8 für die Aufnahme von T₄ in primäre murine Astrozyten in Frage. Sowohl in MCT8^{wt}-Zellen, als auch in MCT8^{P253L}-Zellen, ließ sich die Aufnahme von T₄ durch Behandlung mit NaPB signifikant steigern. In MCT8^{wt}-Zellen war dieser Effekt durch Inkubation mit SC nahezu vollständig reversibel, während die Aufnahme von T₄ in NaPB-behandelte MCT8^{P253L}-Astrozyten nach Inkubation mit SC immer noch signifikant höher war als in unbehandelten MCT8^{P253L}-Astrozyten nach Inkubation mit SC (Abbildung 16). Diese Beobachtungen legen nahe, dass weitere Transportproteine an der Aufnahme von T₄ in MCT8^{P253L}-Astrozyten beteiligt sind, deren Funktion oder Expression durch den Einsatz von NaPB verbessert wird. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in MCT8^{P321L}-iBMECs gemacht (Braun et al., 2022). Die signifikant erhöhte Aufnahme von T₄ in NaPB-behandelte MCT8^{P253L}-Astrozyten nach Inkubation mit SC könnte auf eine veränderte Expression von Transportproteinen in diesen Astrozyten zurückzuführen sein. Es ist möglich, dass in MCT8^{P253L}-Astrozyten Transportproteine zur T₄-Aufnahme beitragen, die nicht durch SC inhibiert werden. In murinen Astrozyten konnte neben MCT8 auch die Expression der Transporter LAT2 und OATP1C1 nachgewiesen werden, wobei LAT2 nur geringe Affinität für T₃ und T₄ besitzt (Braun et al., 2011; Zevenbergen et al., 2015). Um die Beteiligung weiterer Transporter an der gesteigerten T₄-Aufnahme in NaPB-behandelte MCT8^{P253L}-Astrozyten und MCT8^{wt}-Astrozyten zu klären, sind zusätzliche Versuche notwendig. Die Expression von Proteinen mit Transportfunktion für T₄ in Astrozyten kann durch 3'-mRNA-Sequenzierung untersucht werden. Mögliche Kandidaten für die Aufnahme von T₄ sind *Slco1a2*, *Slco1b1*, *Slc1b3*, *Slco3a1*, *Slco4a1*, *Slco4c1*, *Slco6a1*, *Slc10a1* (*Ntcp*), *Slc17a4* und *Lat1*

(*Slc7a5*) (Groeneweg, Van Geest, et al., 2019). Die Daten der 3'-mRNA-Sequenzierung von Cortexgewebe aus MCT8^{P253L}-Mäusen an Postnataltag 21 lieferten keine signifikanten Veränderungen der Genexpression von *Oatp1c1*, *Mct10*, *Lat1* und *Lat2* (Abbildung 13), enthalten jedoch auch das Transkriptom weiterer Zelltypen wie Neuronen und Mikroglia. Zur genaueren Untersuchung der Expression von Schilddrüsenhormontransportern in Astrozyten, wäre eine Analyse durch *single-cell-RNA-sequencing* (scRNA-Seq) denkbar. Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren ließe sich im Rahmen von Transportstudien der Beitrag einzelner Transporter zur T₄-Aufnahme untersuchen. So kann beispielsweise 2-Aminobicyclo[2.2.1]heptan-2-Carbonsäure (BCH) zur Inhibition von LAT1 verwendet werden (Kim et al., 2002). Weitere spezifische Inhibitoren können helfen, die Rolle der anderen genannten Transporter zu bestimmen und damit zur Aufklärung der Mechanismen der T₄-Aufnahme in Astrozyten beitragen.

4.6 Wirkung von NaPB im MCT8^{P253L}-Mausmodell

4.6.1 Wirkung von NaPB auf die Expression von MCT8

Das Potential von NaPB zur Wiederherstellung von Expression und Funktion verschiedener pathogener MCT8-Varianten, konnte in den letzten Jahren mehrfach in Zellmodellen demonstriert werden (Braun et al., 2022; Braun & Schweizer, 2015, 2017, 2020). Im Rahmen dieser Arbeit überprüfte ich die Hypothese, dass NaPB die Expression und Funktion von MCT8 in MCT8^{P253L}-Mäusen verbessern kann. In bisherigen Studien zur Wirksamkeit von NaPB in Zellkultur wurde die Substanz des Herstellers Santa Cruz verwendet (Braun & Schweizer, 2017). Aufgrund des Arzneimittelstandards des Präparates, wurde die Behandlung von MCT8^{P253L}-Mäusen mit NaPB der Firma Sigma Aldrich durchgeführt. Vor Beginn der Tierversuche konnte in MCT8^{P321L} überexprimierenden MDCK1-Zellen gezeigt werden, dass NaPB beider Hersteller Expression und Transportfunktion von MCT8^{P321L} gleichermaßen verbessert (Abbildung 4). Diese Beobachtungen stimmen mit bereits publizierten Ergebnissen überein, die eine verbesserte Expression und Transportfähigkeit von MCT8^{P321L} in überexprimierenden MDCK1-Zellen nach Behandlung mit NaPB zeigen (Zung et al., 2024). Auch in MCT8^{P321L}-iBMECs konnte NaPB Expression und Funktion von MCT8 wiederherstellen (Braun et al., 2022). Entgegen der Hypothese konnte die

reduzierte Expression von MCT8 in Nierengewebe von MCT8^{P253L}-Mäusen in keiner der drei Versuchsgruppen durch den Einsatz von NaPB erhöht werden (Abbildung 7).

4.6.2 Behandlung mit NaPB hat keinen negativen Einfluss auf die körperliche Entwicklung von MCT8^{P253L}-Mäusen

Unter Behandlung mit NaPB gehören Übelkeit und gastrointestinale Beschwerden zu den häufig beschriebenen Nebenwirkungen (European Medicines Agency, 2009). Diese Symptome traten auch bei der Behandlung MCT8-defizienter Patienten mit GPB auf (Schreiner et al., 2024; Zung et al., 2024). Im Rahmen dieser Nebenwirkungen könnte die Nahrungsaufnahme der Versuchstiere beeinträchtigt und ihre körperliche Entwicklung verzögert werden. Als seltene Nebenwirkung von NaPB sind sowohl Gewichtsverlust, als auch Gewichtszunahme beschrieben (European medicine agency, 2009). Als Ursache für Gewichtsverlust unter der Therapie mit NaPB ist unter Berücksichtigung des Stoffwechselweges des Medikaments ein dosisabhängiger Verlust von Aminosäuren denkbar (Iannitti & Palmieri, 2011). Im Rahmen der Behandlung von Harnstoffzyklusdefekten ist dieser Effekt Teil der therapeutischen Wirkung. Bei der Behandlung eines 15 Monate alten Jungen, konnte unter Therapie mit NaPB ein Verlust der Aminosäure Glutamin beobachtet werden (Schreiner et al., 2024). Bei der Behandlung von Mäusen mit NaPB wäre durch den Verlust von Metaboliten eine Wachstumsverzögerung mit Reduktion von Körperlänge und Gewicht vorstellbar. Die Behandlung von juvenilen Mäusen mit 200 mg NaPB/kgKG zeigte jedoch keinen negativen Einfluss auf die körperliche Entwicklung der Tiere. In keiner der drei Versuchsgruppen konnte ein signifikanter Unterschied in Größe und Gewicht NaPB-behandelter MCT8^{P253L}-Mäuse im Vergleich zu NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen und MCT8^{wt}-Mäusen festgestellt werden (Abbildung 5).

4.6.3 NaBP zeigt keine hepatotoxische Wirkung in MCT8^{P253L}-Mäusen

Bei Patienten mit MCT8-Defizienz lässt sich häufig eine milde Erhöhung der Transaminasen im Serum nachweisen, die möglicherweise auf den hyperthyreoten bis thyreotoxischen Hormonstatus der Leber zurückzuführen ist (Groeneweg et al., 2020). Zudem gehört eine Erhöhung der Transaminasen zu den häufigen Nebenwirkungen einer Behandlung mit NaPB (European medicine agency, 2009). Auch während der Therapie MCT8-defizienter Patienten mit GPB im Rahmen individueller Heilversuche, kam es unter hohen Dosen zu teils erheblichen Anstiegen der Leberenzyme (bis auf das Zehnfache des

Referenzbereichs), die eine Pausierung der Therapie notwendig machten (Schreiner et al., 2024; Zung et al., 2024). Wie bereits diskutiert befindet sich auch Lebergewebe von MCT8^{P253L}-Mäusen in einem hyperthyreoten Zustand. Demnach lagen in diesem Versuch zwei Faktoren vor, die potenziell zu einer Erhöhung der Transaminasen im Serum der Versuchstiere führen konnten. Der Vergleich der Aktivität von AST und ALT im Serum von NaPB-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen, NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen und MCT8^{wt}-Mäusen an Postnataltag 14, lieferte keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 6). Demnach führte weder der hyperthyreote Zustand des Lebergewebes, noch die Behandlung der Versuchstiere mit 200 mg/kgKG NaPB zu einer Schädigung der Hepatozyten mit Anstieg der Transaminasen. In anderen Versuchen lag die Aktivität der Transaminasen im Serum von adulten, männlichen C57Bl/6J-Mäusen im Bereich von 4-94 U/l (ALT) und 32-122 U/l (AST), sodass die in diesem Versuch ermittelten Werte als normwertig angesehen werden können (Otto et al., 2016; Wagnerberger et al., 2013).

4.6.4 Wirkung von NaPB auf periphere Organe

Ein wichtiges Ziel in der Therapie der MCT8-Defizienz ist die Normalisierung der derangierten Schilddrüsenhormonspiegel im Blut und dadurch die Reduktion der thyreotoxischen Wirkung auf periphere Organe. Insbesondere im Hinblick auf die Lebensqualität der Patienten, sollte aber auch die Verbesserung der neurologischen Defizite im Vordergrund der Therapieziele stehen. Um die Wirkung von NaPB auf die periphere Hyperthyreose zu beurteilen, können neben einer direkten Bestimmung der Hormone im Blut, Aktivität und Expression des T₃-regulierten Enzyms DIO1 in peripheren Organen herangezogen werden. NaPB zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die erhöhte Aktivität und Expression der DIO1 in Nierengewebe von MCT8^{P253L}-Mäusen (Abbildung 8). In Lebergewebe konnte NaPB die erhöhte *Dio1*-Expression in MCT8^{P253L}-Mäusen an Postnataltag 21 senken (Abbildung 9). Die Daten zur Enzymaktivität in Lebergewebe sind auf Grund eines fehlerhaften Versuchsansatzes bei den jungen Tieren nicht verwertbar.

4.6.5 Wirkung von NaPB auf neuronales Gewebe

Zur Beurteilung der Wirkung von NaPB auf cerebrales Gewebe wurde die Expression T₃-regulierter Gene in Cortexgewebe von NaPB-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen und NaCl-behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen verglichen. Insgesamt zeigten MCT8^{P253L}-Mäuse im

Vergleich zu MCT8^{wt}-Mäusen nur geringe Veränderungen der Genexpression. Dennoch weisen die Daten auf einen hypothyreoten Zustand im Gehirn von MCT8^{P253L}-Mäusen hin. Zusätzlich ließ sich aus den Daten der 3'-mRNA-Sequenzierung ein positiver Effekt der Behandlung von MCT8^{P253L}-Mäusen mit NaPB ableiten. MCT8^{P253L}-Mäuse zeigten eine signifikant erhöhte Expression des T₃-regulierten Gens *Dgkg*, die durch Behandlung der Tiere mit NaPB normalisiert wurde (Abbildung 11). Auch die Expression des Gens *Nefh*, das positiv durch T₃ reguliert wird, war in NaPB behandelten MCT8^{P253L}-Mäusen signifikant erhöht (Abbildung 10). Die T₃ regulierten Gene *Afp111*, *Sema7a*, *Sla* und *Vwc2l* zeigten ebenfalls eine Tendenz zur Normalisierung der Expression in Richtung Wildtyp, allerdings war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Um den positiven Effekt von NaPB auf cerebrales Gewebe von MCT8^{P253L}-Mäusen abschließend beurteilen zu können, ist angesichts der beobachteten Effektgröße eine Erhöhung der Stichprobengröße notwendig.

Neben einer Erhöhung der Stichprobengröße sollte eine Erhöhung der NaPB-Dosis bzw. die Wahl einer anderen Darreichungsform in Betracht gezogen werden, um ein besseres Behandlungsergebnis auch in Bezug auf periphere Gewebe wie Leber und Niere zu erzielen. Da in diesem Versuch neugeborene Mäuse untersucht wurden, war eine direkte Applikation von NaPB über das Trinkwasser, wie von anderen Autoren beschrieben, nicht möglich. Als einfach anwendbare Alternative wurde NaPB subkutan appliziert. Da diese Form der Anwendung bei Mäusen bisher noch nicht beschrieben ist, gibt es keine Daten zur Pharmakokinetik und Wirksamkeit von NaPB nach subkutaner Applikation. Die Effekte von NaPB wurden bereits im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen untersucht ('He & 'Moreau, 2019; Iannitti & Palmieri, 2011). Dabei wurden sowohl klinische Studien am Menschen, als auch Tierversuche mit Nagern beschrieben. In den aufgeführten Tierversuchen lag die verwendete Dosis NaPB im Bereich von 0,1-2 g/kgKG/d und das Medikament wurde bevorzugt oral über das Trinkwasser der Tiere verabreicht. Dabei wurden Dosen von 0,5–2 g/kgKG/d eingesetzt. Andere Autoren applizierten NaPB intraperitoneal. Bei intraperitonealer Applikation war die verwendete Menge NaPB geringer und lag zwischen 100 und 200 mg/kgKG/d ('He & 'Moreau, 2019). In klinischen Studien an Patienten wurde NaPB in der Regel ebenfalls oral oder intravenös verabreicht, die Dosis lag in den meisten Fällen im Bereich der zugelassenen Dosis zur Therapie von

Harnstoffzyklusdefekten (450-600 mg/kgKG, (European medicine agency, 2009; 'He & 'Moreau, 2019). Verglichen mit der Dosierung von NaPB die in anderen Versuchen Wirkung zeigte, war die hier verwendete Dosis von 200 mg/kgKG relativ gering. Besonders bei oraler Gabe von NaPB wurden in anderen Versuchen wesentlich höhere Mengen eingesetzt. Daher sollte in Betracht gezogen werden, dass die verwendete Dosis NaPB nicht ausreichend war, um wirksame Serumspiegel zu erreichen.

5. Zusammenfassung

Die seltene X-chromosomale Erkrankung MCT8-Defizienz wird durch Mutationen im Gen *SCL16A2* verursacht, die die Funktion des Schilddrüsenhormontransporters MCT8 beeinträchtigen. Die pathogene Variante MCT8^{P321L} wurde in Zwillingsbrüdern entdeckt und verursacht schwere neurologische Defizite und Entwicklungsstörungen bei betroffenen Patienten. Obwohl die Mutation P321L nicht in der Substratbindungsstelle von MCT8 lokalisiert ist, verursacht sie einen vollständigen Funktionsverlust des Transporters. Untersuchungen in verschiedenen Zellmodellen konnten eine Abhängigkeit der Expression von MCT8^{P321L} vom zellulären Kontext nachweisen. Eine Hypothese zur Erklärung dieser Beobachtungen, beruht auf einer veränderten Struktur von MCT8^{P321L}, die die Proteinstabilität beeinträchtigt. Die Suche nach Therapiemöglichkeiten zur Behandlung der MCT8-Defizienz umfasst verschiedene Bereiche, die vom Einsatz thyreomimetischer Substanzen bis zu gentherapeutischen Ansätzen reichen. In dieser Arbeit wurde auf Grundlage der Hypothese einer reduzierten Proteinstabilität, das Potential des chemischen Chaperons NaPB zur Verbesserung der Transportfähigkeit von MCT8^{P253L} in einem komplexen Organismus untersucht. Die murine Mutation P253L entspricht der humanen Variante P321L. Darüber hinaus sollte das verwendete Mausmodell MCT8^{P253L} genutzt werden um weitere Daten zu den Auswirkungen der Mutation P253L auf verschiedene Organsysteme *in vivo* zu gewinnen. In Übereinstimmung mit Beobachtungen in adulten MCT8^{P253L}-Mäusen und *Mct8*ko-Mäusen konnte gezeigt werden, dass sich Leber- und Nierengewebe von MCT8^{P253L} in einem hyperthyreoten Zustand befinden, während das Hirngewebe juveniler MCT8^{P253L}-Mäuse Anzeichen einer Hypothyreose aufweist. Die Mutation P253L führt zu einer reduzierten Expression von MCT8 in Nierengewebe, während die Expression in Lebergewebe erhalten ist. Damit konnte in dieser Arbeit erstmals die zelltypabhängige Expression der Variante MCT8^{P253L} in einem *in vivo* Modell bestätigt werden. In MCT8^{P321L}-iBMECs konnten Expression und Funktion von MCT8^{P321L} durch NaPB wiederhergestellt werden. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit in MCT8^{P321L}-überexprimierenden MDCK1-Zellen bestätigt werden. Im Kontrast dazu hatte NaPB in diesem Versuch keine Wirkung auf die Aufnahme von T₃ in MCT8^{P253L}-Astrozyten. Überraschenderweise zeigte sich, dass MCT8 eine untergeordnete Rolle bei der Aufnahme von T₄ in murine Astrozyten spielt. Dennoch konnte NaPB die T₄-Aufnahme in primäre MCT8^{P253L}-

Astrozyten - vermutlich durch Effekte auf weitere Transportproteine - verbessern. Auch in MCT8^{P321L}-iBMECs wurde bereits eine MCT8-unabhängige, positive Wirkung von NaPB auf die Aufnahme von T₃ und T₄ beobachtet. Die Behandlung von juvenilen MCT8^{P253L}-Mäusen mit 200 mg/kgKG NaPB konnte die reduzierte Expression von MCT8 in Nierengewebe nicht wiederherstellen. NaPB hatte einen geringen Einfluss auf die Expression des Enzyms DIO1, einem Marker für eine hyperthyreote Stoffwechsellage, in Lebergewebe. Die Expression von T₃-regulierten Genen im Cortex von MCT8^{P253L}-Mäusen konnte durch den Einsatz von NaPB teilweise normalisiert werden. Im Vergleich zu den Effekten von NaPB in Zellkultur, war die Wirkung des Medikaments in MCT8^{P253L}-Mäusen zwar gering, die Daten zur Genexpression im Gehirn der Versuchstiere weisen jedoch darauf hin, dass NaPB das Potential hat die Expression T₃ regulierter Gene im Gehirn von MCT8^{P253L}-Mäusen zu normalisieren. Um die Wirkung von NaPB auf MCT8^{P253L}-Mäuse abschließend beurteilen zu können, sind weitere Versuche notwendig. Neben einer Erhöhung der Stichprobengröße sollten hierbei alternative Applikationsformen und höhere Dosierungen in Betracht gezogen werden, um ausreichend hohe Serumspiegel bei den Versuchstieren zu erzielen.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Behandlung von MDCK1-Zellen.....	44
Abbildung 2: Astrozyten aussäen.....	46
Abbildung 3: T ₃ -/T ₄ -Aufnahme in primäre Astrozyten.....	47
Abbildung 4: NaPB verbessert Expression und Transportfähigkeit von MCT8 ^{P321L} in überexprimierenden MDCK1-Zellen.....	49
Abbildung 5: Körperliche Entwicklung von MCT8 ^{P253L} -Mäusen.....	50
Abbildung 6: Transaminasen im Serum von MCT8 ^{P253L} -Mäusen unter Behandlung mit NaPB.....	51
Abbildung 7: MCT8-Expression in Leber- und Nierengewebe von MCT8 ^{P253L} -Mäusen .	52
Abbildung 8: Enzymaktivität und Expression der Dejodase 1 in Nierengewebe von MCT8 ^{P253L} -Mäusen	54
Abbildung 9: Enzymaktivität und mRNA-Level der Dejodase 1 in Lebergewebe von MCT8 ^{P253L} -Mäusen	55
Abbildung 10: T ₃ -positiv regulierte Gene mit verringerter Expression in Cortextgewebe MCT8 ^{P253L} -Mäusen	57
Abbildung 11: T ₃ -negativ regulierte Gene mit erhöhter Expression in Cortextgewebe MCT8 ^{P253L} -Mäusen	58
Abbildung 12: T ₃ -regulierte Gene mit unveränderter Expression in Cortextgewebe MCT8 ^{P253L} -Mäusen	59
Abbildung 13: Expression von Transportproteinen mit Affinität für Schilddrüsenhormone in Cortextgewebe von 21 Tage alten Mäusen.....	60
Abbildung 14: T ₃ - und T ₄ -Aufnahme in primäre MCT8 ^{P253L} -Astrozyten.....	61

Abbildung 15: Einfluss von NaPB auf die Aufnahme von ^{125}I -T ₃ in primäre MCT8 ^{P253L} -Astrozyten	62
Abbildung 16: Einfluss von NaPB auf die Aufnahme von ^{125}I -T ₄ in primäre MCT8 ^{P253L} -Astrozyten	63
Abbildung 17: DIO1-Aktivität in Lebergewebe von P21 MCT8 ^{P253L} -Mäusen	69

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleichende Darstellung der Mausmodelle	21
Tabelle 2: Software	28
Tabelle 3: Geräte	29
Tabelle 4: Kreuzungsschema.....	30
Tabelle 5: Puffer-Zusammensetzung Genotypisierung	31
Tabelle 6: PCR-Ansätze.....	32
Tabelle 7: Zusammensetzung Puffer	34
Tabelle 8: Zusammensetzung SDS-Page	35
Tabelle 9: Proteinmenge Western Blot.....	35
Tabelle 10: Antikörperverdünnungen	36
Tabelle 11: Puffer Dejodase-Assay	37
Tabelle 12: Substratmix Dejodase-Assay	37
Tabelle 13: Reagenzien zur Bestimmung der Transaminasen.....	40
Tabelle 14: cDNA-Synthese	41
Tabelle 15: RT-PCR Ansatz.....	41
Tabelle 16: Zellkultur Medien	42
Tabelle 17: Zellzahl	43

8. Literaturverzeichnis

Allan, W., Herndon, C. N., & Dudley, F. C. (1944). Some examples of the inheritance of mental deficiency: apparently sex-linked idiocy and microcephaly. *American Journal of Mental Deficiency*, 48(4).

Alliance of Genome Resources. (2024, July 17). *VWC2L*

Ausó, E., Lavado-Autric, R., Cuevas, E., Escobar Del Rey, F., Morreale De Escobar, G., & Berbel, P. (2004). A moderate and transient deficiency of maternal thyroid function at the beginning of fetal neocortico-genesis alters neuronal migration. *Endocrinology*, 145(9). <https://doi.org/10.1210/en.2004-0274>

Bárez-López, S., Grijota-Martínez, C., Ausó, E., Fernández-De Frutos, M., Montero-Pedrazuela, A., & Guadaño-Ferraz, A. (2019). Adult Mice Lacking Mct8 and Dio2 Proteins Present Alterations in Peripheral Thyroid Hormone Levels and Severe Brain and Motor Skill Impairments. *Thyroid*, 29(11). <https://doi.org/10.1089/thy.2019.0068>

Bernal, J. (2000). Thyroid Hormones in Brain Development and Function. In *Endotext*.

Bianco, A. C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M. J., & Larsen, P. R. (2002). Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine seleno-deiodinases. In *Endocrine Reviews* (Vol. 23, Issue 1). <https://doi.org/10.1210/edrv.23.1.0455>

Braun, D., Bohleber, S., Vatine, G. D., Svendsen, C. N., & Schweizer, U. (2022). Sodium Phenylbutyrate Rescues Thyroid Hormone Transport in Brain Endothelial-Like Cells. *Thyroid*, 32(7). <https://doi.org/10.1089/thy.2021.0643>

Braun, D., Kinne, A., Brauer, A. U., Sapin, R., Klein, M. O., Köhrle, J., Wirth, E. K., & Schweizer, U. (2011). Developmental and cell type-specific expression of thyroid hormone

transporters in the mouse brain and in primary brain cells. *GLIA*, 59(3). <https://doi.org/10.1002/glia.21116>

Braun, D., & Schweizer, U. (2015). Efficient activation of pathogenic Δ phe501 mutation in monocarboxylate transporter 8 by chemical and pharmacological chaperones. *Endocrinology (United States)*, 156(12). <https://doi.org/10.1210/en.2015-1393>

Braun, D., & Schweizer, U. (2017). The chemical chaperone phenylbutyrate rescues MCT8 mutations associated with milder phenotypes in patients with Allan-Herndon-Dudley syndrome. *Endocrinology*, 158(3). <https://doi.org/10.1210/en.2016-1530>

Braun, D., & Schweizer, U. (2020). The Protein Translocation Defect of MCT8L291RIs Rescued by Sodium Phenylbutyrate. *European Thyroid Journal*, 9(5). <https://doi.org/10.1159/000507439>

Brown, C. R., Hong-Brown, L. Q., Biwersi, J., Verkman, A. S., & Welch, W. J. (1996). Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the Δ F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress and Chaperones*, 1(2). [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(1996\)001<0117:CCCTMP>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(1996)001<0117:CCCTMP>2.3.CO;2)

Carlson, H. E., & Hershman, J. M. (1975). The hypothalamic pituitary thyroid axis. *Medical Clinics of North America*, 59(5). [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)31955-1](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)31955-1)

Chen, J., Salveridou, E., Liebmann, L., Sundaram, S. M., Doycheva, D., Markova, B., Hübner, C. A., Boelen, A., Visser, W. E., Heuer, H., & Mayerl, S. (2023). Triac Treatment Prevents Neurodevelopmental and Locomotor Impairments in Thyroid Hormone Transporter Mct8/Oatp1c1 Deficient Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4). <https://doi.org/10.3390/ijms24043452>

Di Cosmo, C., Liao, X. H., Dumitrescu, A. M., Weiss, R. E., & Refetoff, S. (2009). A thyroid hormone analog with reduced dependence on the monocarboxylate transporter 8 for tissue transport. *Endocrinology*, 150(9). <https://doi.org/10.1210/en.2009-0209>

Dumitrescu, A. M., Liao, X. H., Best, T. B., Brockmann, K., & Refetoff, S. (2004). A Novel Syndrome Combining Thyroid and Neurological Abnormalities Is Associated with Mutations in a Monocarboxylate Transporter Gene. *American Journal of Human Genetics*, 74(1).

<https://doi.org/10.1086/380999>

Dumitrescu, A. M., Liao, X. H., Weiss, R. E., Millen, K., & Refetoff, S. (2006a). Tissue-specific thyroid hormone deprivation and excess in monocarboxylate transporter (Mct) 8-deficient mice. *Endocrinology*, 147(9), 4036–4043. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0390>

Elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (Trikafta) for cystic fibrosis. (2020). *The Medical Letter on Drugs and Therapeutics*, 62(1589).

European medicine agency. (2009). *Ammonaps - Product information*. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/ammonaps#product-information-section>

European Medicines Agency. (2015, December 18). *Ravicti - Product information*. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/ravicti>

Ferrara, A. M., Liao, X. H., Gil-Ibáñez, P., Bernal, J., Weiss, R. E., Dumitrescu, A. M., & Refetoff, S. (2014). Placenta passage of the thyroid hormone analog DITPA to male wild-type and Mct8-deficient mice. *Endocrinology (United States)*, 155(10). <https://doi.org/10.1210/en.2014-1085>

Ferrara, A. M., Liao, X. H., Gil-Ibáñez, P., Marcinkowski, T., Bernal, J., Weiss, R. E., Dumitrescu, A. M., & Refetoff, S. (2013). Changes in thyroid status during perinatal development of MCT8-deficient male mice. *Endocrinology*, 154(7). <https://doi.org/10.1210/en.2012-2031>

Ford, G., & Lafranchi, S. H. (2014). Screening for congenital hypothyroidism: A worldwide view of strategies. In *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* (Vol. 28, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.beem.2013.05.008>

Friesema, E. C. H., Grueters, P. A., Biebermann, H., Krude, H., Von Moers, A., Reeser, M., Barrett, T. G., Mancilla, E. E., Svensson, J., Kester, M. H. A., Kuiper, G. G. J. M., Balkassmi, S., Uitterlinden, A. G., Koehrle, P. J., Rodien, P., Halestrap, P. A. P., & Visser, P. T. J. (2004). Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet*, 364(9443). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17226-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17226-7)

Friesema, E. C. H., Visser, W. E., & Visser, T. J. (2010). Genetics and phenomics of thyroid hormone transport by MCT8. In *Molecular and Cellular Endocrinology* (Vol. 322, Issues 1–2). <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.01.016>

Gene Cards. (2024, August 5). DGKG.

Gereben, B., Zavacki, A. M., Ribich, S., Kim, B. W., Huang, S. A., Simonides, W. S., Zeöld, A., & Bianco, A. C. (2008). Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. In *Endocrine Reviews* (Vol. 29, Issue 7). <https://doi.org/10.1210/er.2008-0019>

Gilbert, M. E., Sui, L., Walker, M. J., Anderson, W., Thomas, S., Smoller, S. N., Schon, J. P., Phani, S., & Goodman, J. H. (2007). Thyroid hormone insufficiency during brain development reduces parvalbumin immunoreactivity and inhibitory function in the hippocampus. *Endocrinology*, 148(1). <https://doi.org/10.1210/en.2006-0164>

Grijota-Martínez, C., Báñez-López, S., Gómez-Andrés, D., & Guadaño-Ferraz, A. (2020). MCT8 Deficiency: The Road to Therapies for a Rare Disease. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 14). <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00380>

Groeneweg, S., Peeters, R. P., Moran, C., Stoupa, A., Auriol, F., Tonduti, D., Dica, A., Paone, L., Rozenkova, K., Malikova, J., van der Walt, A., de Coo, I. F. M., McGowan, A., Lyons, G., Aarsen, F. K., Barca, D., van Beynum, I. M., van der Knoop, M. M., Jansen, J. Visser, W. E. (2019). Effectiveness and safety of the tri-iodothyronine analogue Triac in children and adults with MCT8 deficiency: an international, single-arm, open-label, phase

2 trial. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 7(9). [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(19\)30155-X](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30155-X)

Groeneweg, S., van Geest, F. S., Abaci, A., Alcantud, A., Ambegaonkar, G. P., Armour, C. M., Bakhtiani, P., Barca, D., Bertini, E. S., van Beynum, I. M., Brunetti-Pierri, N., Bugiani, M., Cappa, M., Cappuccio, G., Castellotti, B., Castiglioni, C., Chatterjee, K., de Coo, I. F. M., Coutant, R., ... Visser, W. E. (2020). Disease characteristics of MCT8 deficiency: an international, retrospective, multicentre cohort study. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 8(7). [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30153-4](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30153-4)

Groeneweg, S., Van Geest, F. S., Peeters, R. P., Heuer, H., & Visser, W. E. (2019). Thyroid Hormone Transporters. In *Endocrine Reviews* (Vol. 41, Issue 2). <https://doi.org/10.1210/endrev/bnz008>

Haddow, J. E., Palomaki, G. E., Allan, W. C., Williams, J. R., Knight, G. J., Gagnon, J., O'Heir, C. E., Mitchell, M. L., Hermos, R. J., Waisbren, S. E., Faix, J. D., & Klein, R. Z. (1999). Maternal Thyroid Deficiency during Pregnancy and Subsequent Neuropsychological Development of the Child. *New England Journal of Medicine*, 341(8). <https://doi.org/10.1056/nejm199908193410801>

Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. In *Nature* (Vol. 475, Issue 7356). <https://doi.org/10.1038/nature10317>

'He, B., & 'Moreau, R. (2019). Lipid-regulating properties of butyric acid and 4-phenylbutyric acid: Molecular mechanisms and therapeutic applications. *Pharmacological Research*.

Hennemann, G., Docter, R., Friesema, E. C. H., De Jong, M., Krenning, E. P., & Visser, T. J. (2001). Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. In *Endocrine Reviews* (Vol. 22, Issue 4). <https://doi.org/10.1210/edrv.22.4.0435>

Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: Controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 13, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/nrm3270>

Hintze, G., & Derwahl, M. (2010). [Hypothyreodism. From the latent functional disorder up to coma]. *Der Internist*, 51(5).

Holden, K. R., Zuñiga, O. F., May, M. M., Su, H., Molinero, M. R., Rogers, R. C., & Schwartz, C. E. (2005). X-linked MCT8 gene mutations: Characterization of the pediatric neurologic phenotype. *Journal of Child Neurology*, 20(10). <https://doi.org/10.1177/08830738050200101601>

Howdeshell, K. L. (2002). A model of the development of the brain as a construct of the thyroid system. In *Environmental Health Perspectives* (Vol. 110, Issue SUPPL. 3). <https://doi.org/10.1289/ehp.02110s3337>

Iannitti, T., & Palmieri, B. (2011). Clinical and experimental applications of sodium phenylbutyrate. In *Drugs in R and D* (Vol. 11, Issue 3). <https://doi.org/10.2165/11591280-000000000-00000>

Iwayama, H., Liao, X. H., Braun, L., Báñez-López, S., Kaspar, B., Weiss, R. E., Dumitrescu, A. M., Guadaño-Ferraz, A., & Refetoff, S. (2016). Adeno Associated Virus 9-Based Gene Therapy Delivers a Functional Monocarboxylate Transporter 8, Improving Thyroid Hormone Availability to the Brain of Mct8-Deficient Mice. *Thyroid*, 26(9). <https://doi.org/10.1089/thy.2016.0060>

Jansen, J., Friesema, E. C. H., Kester, M. H. A., Milici, C., Reeser, M., Grütters, A., Barrett, T. G., Mancilla, E. E., Svensson, J., Wemeau, J. L., Canalli, M. H. B. D. S., Lundgren, J., McEntagart, M. E., Hopper, N., Arts, W. F., & Visser, T. J. (2007). Functional analysis of monocarboxylate transporter 8 mutations identified in patients with X-linked psychomotor retardation and elevated serum triiodothyronine. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(6). <https://doi.org/10.1210/jc.2006-2570>

Jansen, J., Friesema, E. C. H., Kester, M. H. A., Schwartz, C. E., & Visser, T. J. (2008). Genotype-phenotype relationship in patients with mutations in thyroid hormone transporter MCT8. *Endocrinology*, *149*(5). <https://doi.org/10.1210/en.2007-1475>

Jansen, J., Friesema, E. C. H., Milici, C., & Visser, T. J. (2005). Thyroid hormone transporters in health and disease. In *Thyroid* (Vol. 15, Issue 8). <https://doi.org/10.1089/thy.2005.15.757>

Johannes, J., Jayarama-Naidu, R., Meyer, F., Wirth, E. K., Schweizer, U., Schomburg, L., Köhrle, J., & Renko, K. (2016). Silychristin, a flavonolignan derived from the milk thistle, is a potent inhibitor of the thyroid hormone transporter MCT8. *Endocrinology*, *157*(4). <https://doi.org/10.1210/en.2015-1933>

Johnson, J. L., & Felicetta, J. V. (1992). Hyperthyroidism: A Comprehensive Review. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, *4*(1). <https://doi.org/10.1111/j.1745-7599.1992.tb01105.x>

Kersseboom, S., Horn, S., Edward Visser, W., Chen, J., Friesema, E. C. H., Vaurs-Barrière, C., Peeters, R. P., Heuer, H., & Visser, T. J. (2014). In vitro and mouse studies supporting therapeutic utility of triiodothyroacetic acid in MCT8 deficiency. *Molecular Endocrinology*, *28*(12). <https://doi.org/10.1210/me.2014-1135>

Kersseboom, S., Kremers, G. J., Friesema, E. C. H., Edward Visser, W., Klootwijk, W., Peeters, R. P., & Visser, T. J. (2013). Mutations in MCT8 in patients with Allan-Herndon-Dudley-Syndrome affecting its cellular distribution. *Molecular Endocrinology*, *27*(5). <https://doi.org/10.1210/me.2012-1356>

Kim, D. K., Kanai, Y., Choi, H. W., Tangtrongsup, S., Chairoungdua, A., Babu, E., Tachampa, K., Anzai, N., Iribe, Y., & Endou, H. (2002). Characterization of the system L amino acid transporter in T24 human bladder carcinoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1565*(1). [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00516-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00516-3)

Kinne, A., Roth, S., Biebermann, H., Köhrle, J., Grüters, A., & Schweizer, U. (2009). Surface translocation and tri-iodothyronine uptake of mutant MCT8 proteins are cell type-dependent. *Journal of Molecular Endocrinology*, 43(6). <https://doi.org/10.1677/JME-09-0043>

Liao, X. H., Di Cosmo, C., Dumitrescu, A. M., Hernandez, A., Van Sande, J., St. Germain, D. L., Weiss, R. E., Galton, V. A., & Refetoff, S. (2011). Distinct roles of deiodinases on the phenotype of Mct8 defect: A comparison of eight different mouse genotypes. *Endocrinology*, 152(3). <https://doi.org/10.1210/en.2010-0900>

Madariaga, A. G., Santos Palacios, S., Guillén-Grima, F., & Galofré, J. C. (2014). The incidence and prevalence of thyroid dysfunction in Europe: A meta-analysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(3). <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2409>

Maia, A. L., Goemann, I. M., Meyer, E. L. S., & Wajner, S. M. (2011). Deiodinases: the balance of thyroid hormone: type 1 iodothyronine deiodinase in human physiology and disease. *The Journal of Endocrinology*, 209(3).

Mayerl, S., Müller, J., Bauer, R., Richert, S., Kassmann, C. M., Darras, V. M., Buder, K., Boelen, A., Visser, T. J., & Heuer, H. (2014). Transporters MCT8 and OATP1C1 maintain murine brain thyroid hormone homeostasis. *Journal of Clinical Investigation*, 124(5). <https://doi.org/10.1172/JCI70324>

Messier, N., & Langlois, M. F. (2000). Triac regulation of transcription is T3 receptor isoform- and response element-specific. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 165(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(00\)00266-5](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(00)00266-5)

Morte, B., Ceballos, A., Diez, D., Grijota-Martínez, C., Dumitrescu, A. M., Di Cosmo, C., Galton, V. A., Refetoff, S., & Bernal, J. (2010). Thyroid hormone-regulated mouse cerebral cortex genes are differentially dependent on the source of the hormone: A study in monocarboxylate transporter-8- and deiodinase-2-deficient mice. *Endocrinology*, 151(5). <https://doi.org/10.1210/en.2009-0944>

Morte, B., Gil-Ibañez, P., Heuer, H., & Bernal, J. (2021). Brain gene expression in systemic hypothyroidism and mouse models of MCT8 deficiency: The Mct8-Oatp1c1-Dio2 triad. *Thyroid*, 31(6). <https://doi.org/10.1089/thy.2020.0649>

Namba, N., Etani, Y., Kitaoka, T., Nakamoto, Y., Nakacho, M., Bessho, K., Miyoshi, Y., Mushiake, S., Mohri, I., Arai, H., Taniike, M., & Ozono, K. (2008). Clinical phenotype and endocrinological investigations in a patient with a mutation in the MCT8 thyroid hormone transporter. *European Journal of Pediatrics*, 167(7). <https://doi.org/10.1007/s00431-007-0589-6>

Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., & Chandu, D. (2006). The ubiquitin-proteasome system. In *Journal of Biosciences* (Vol. 31, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/BF02705243>

Ortiga-Carvalho, T. M., Chiamolera, M. I., Pazos-Moura, C. C., & Wondisford, F. E. (2016). Hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Comprehensive Physiology*, 6(3). <https://doi.org/10.1002/cphy.c150027>

Otto, G. P., Rathkolb, B., Oestereicher, M. A., Lengger, C. J., Moerth, C., Micklich, K., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Wolf, E., & De Angelis, M. H. (2016). Clinical chemistry reference intervals for C57BL/6J, C57BL/6N, and C3HeB/FeJ mice (*Mus musculus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 55(4).

Papadimitriou, A., Dumitrescu, A. M., Papavasiliou, A., Fretzayas, A., Nicolaidou, P., & Refetoff, S. (2008). A novel monocarboxylate transporter 8 gene mutation as a cause of severe neonatal hypotonia and developmental delay. *Pediatrics*, 121(1). <https://doi.org/10.1542/peds.2007-1247>

Paskevicius, T., Farraj, R. A., Michalak, M., & Agellon, L. B. (2023). Calnexin, More Than Just a Molecular Chaperone. In *Cells* (Vol. 12, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/cells12030403>

Patel, J., Landers, K., Li, H., Mortimer, R. H., & Richard, K. (2011). Thyroid hormones and fetal neurological development. In *Journal of Endocrinology* (Vol. 209, Issue 1). <https://doi.org/10.1530/JOE-10-0444>

Pop, V. J., Kuijpers, J. L., Van Baar, A. L., Verkerk, G., Van Son, M. M., De Vijlder, J. J., Vulsmá, T., Wiersinga, W. M., Drexhage, H. A., & Vader, H. L. (1999). Low maternal free thyroxine concentrations during early pregnancy are associated with impaired psychomotor development in infancy. *Clinical Endocrinology*, 50(2). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2265.1999.00602.x>

Rice, D., & Barone, S. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. *Environmental Health Perspectives*, 108(SUPPL. 3). <https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3511>

Richard, S., Ren, J., & Flamant, F. (2023). Thyroid hormone action during GABAergic neuron maturation: The quest for mechanisms. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 14). <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1256877>

Rivkees, S. A., & Mattison, D. R. (2009). Ending Propylthiouracil-Induced Liver Failure in Children. *New England Journal of Medicine*, 360(15). <https://doi.org/10.1056/nejmc0809750>

Roberts, L. M., Woodford, K., Zhou, M., Black, D. S., Haggerty, J. E., Tate, E. H., Grindstaff, K. K., Mengesha, W., Raman, C., & Zerangue, N. (2008). Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLCO1C1) at the blood-brain barrier. *Endocrinology*, 149(12). <https://doi.org/10.1210/en.2008-0378>

Rubenstein, R. C., Egan, M. E., & Zeitlin, P. L. (1997). In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing $\Delta F08$ -CFTR. *Journal of Clinical Investigation*, 100(10). <https://doi.org/10.1172/JCI119788>

Rubenstein, R. C., & Zeitlin, P. L. (1998). A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in δ F508-Homozygous cystic fibrosis patients: Partial restoration of nasal epithelial CFTR function. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 157(2). <https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.2.9706088>

Sabatino, L., Vassalle, C., Del Seppia, C., & Iervasi, G. (2021). Deiodinases and the three types of thyroid hormone deiodination reactions. In *Endocrinology and Metabolism* (Vol. 36, Issue 5). <https://doi.org/10.3803/EnM.2021.1198>

Santa Cruz. (2024, September 26). *Sodium phenylbutyrate*. <https://www.scbt.com/de/p/sodium-phenylbutyrate-1716-12-7>

Schreiner, F., Vollbach, H., Sonntag, N., Schempp, V., Gohlke, B., Friese, J., Woelfle, J., Braun, D., & Schweizer, U. (2024). Phenylbutyrate Treatment in a Boy with MCT8 Deficiency: Improvement of Thyroid Function Tests and Possible Livertoxicity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgae356>

Schweizer, U., & Köhrle, J. (2013). Function of thyroid hormone transporters in the central nervous system. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1830, Issue 7). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.07.015>

Sigma Aldrich. (2024, September 26). *4-Phenylbuttersäure Natriumsalz*. <https://www.sig-maaldrich.com/DE/de/product/usp/1614512>

Streckfuß, F., Hamann, I., Schomburg, L., Michaelis, M., Sapin, R., Klein, M. O., Köhrle, J., & Schweizer, U. (2005). Hepatic deiodinase activity is dispensable for the maintenance of normal circulating thyroid hormone levels in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(2). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.102>

Sundaram, S. M., Arrulo Pereira, A., Müller-Fielitz, H., Köpke, H., De Angelis, M., Müller, T. D., Heuer, H., Körbelin, J., Krohn, M., Mittag, J., Nogueiras, R., Prevot, V., &

Schwaninger, M. (2022). Gene therapy targeting the blood-brain barrier improves neurological symptoms in a model of genetic MCT8 deficiency. *Brain*, 145(12). <https://doi.org/10.1093/brain/awac243>

Trajkovic, M., Visser, T. J., Mittag, J., Horn, S., Lukas, J., Darras, V. M., Raivich, G., Bauer, K., & Heuer, H. (2007a). Abnormal thyroid hormone metabolism in mice lacking the monocarboxylate transporter 8. *Journal of Clinical Investigation*, 117(3). <https://doi.org/10.1172/JCI28253>

Trajkovic-Arsic, M., Visser, T. J., Darras, V. M., Friesema, E. C. H., Schlott, B., Mittag, J., Bauer, K., & Heuer, H. (2010a). Consequences of monocarboxylate transporter 8 deficiency for renal transport and metabolism of thyroid hormones in mice. *Endocrinology*, 151(2). <https://doi.org/10.1210/en.2009-1053>

Valcárcel-Hernández, V., Guillén-Yunta, M., Bueno-Arribas, M., Montero-Pedrazuela, A., Grijota-Martínez, C., Markossian, S., García-Aldea, Á., Flamant, F., Báñez-López, S., & Guadaño-Ferraz, A. (2022). A CRISPR/Cas9-engineered avatar mouse model of monocarboxylate transporter 8 deficiency displays distinct neurological alterations. *Neurobiology of Disease*, 174. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105896>

Vatine, G. D., Al-Ahmad, A., Barriga, B. K., Svendsen, S., Salim, A., Garcia, L., Garcia, V. J., Ho, R., Yucer, N., Qian, T., Lim, R. G., Wu, J., Thompson, L. M., Spivia, W. R., Chen, Z., Van Eyk, J., Palecek, S. P., Refetoff, S., Shusta, E. V., & Svendsen, C. N. (2017). Modeling Psychomotor Retardation using iPSCs from MCT8-Deficient Patients Indicates a Prominent Role for the Blood-Brain Barrier. *Cell Stem Cell*, 20(6). <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.04.002>

Vaurs-Barrière, C., Deville, M., Sarret, C., Giraud, G., Des Portes, V., Prats-Viñas, J. M., De Michele, G., Dan, B., Brady, A. F., Boespflug-Tanguy, O., & Touraine, R. (2009). Pelizaeus-merzbacher-like disease presentation of MCT8 mutated male subjects. *Annals of Neurology*, 65(1). <https://doi.org/10.1002/ana.21579>

Verge, C. F., Konrad, D., Cohen, M., Di Cosmo, C., Dumitrescu, A. M., Marcinkowski, T., Hameed, S., Hamilton, J., Weiss, R. E., & Refetoff, S. (2012). Diiodothyropropionic acid (DITPA) in the treatment of MCT8 deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(12). <https://doi.org/10.1210/jc.2012-2556>

Visser, W. E., Vrijmoeth, P., Visser, F. E., Arts, W. F. M., Van Toor, H., & Visser, T. J. (2013). Identification, functional analysis, prevalence and treatment of monocarboxylate transporter 8 (MCT8) mutations in a cohort of adult patients with mental retardation. *Clinical Endocrinology*, 78(2). <https://doi.org/10.1111/cen.12023>

Wagner, M. S., Wajner, S. M., Dora, J. M., & Maia, A. L. (2007). Regulation of Dio2 gene expression by thyroid hormones in normal and type 1 deiodinase-deficient C3H mice. *Journal of Endocrinology*, 193(3). <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0099>

Wagnerberger, S., Fiederlein, L., Kanuri, G., Stahl, C., Millionig, G., Mueller, S., Bischoff, S. C., & Bergheim, I. (2013). Sex-specific differences in the development of acute alcohol-induced liver steatosis in mice. *Alcohol and Alcoholism*, 48(6). <https://doi.org/10.1093/alcalc/agt138>

Wassner, A. J. (2017). Pediatric Hypothyroidism: Diagnosis and Treatment. *Pediatric Drugs*, 19(4). <https://doi.org/10.1007/s40272-017-0238-0>

Westholm, D. E., Salo, D. R., Viken, K. J., Rumbley, J. N., & Anderson, G. W. (2009). The blood-brain barrier thyroxine transporter organic anion-transporting polypeptide 1c1 displays atypical transport kinetics. *Endocrinology*, 150(11). <https://doi.org/10.1210/en.2009-0769>

Wirth, E. K., Rijntjes, E., Meyer, F., Köhrle, J., & Schweizer, U. (2015). High T3, Low T4 Serum Levels in Mct8 Deficiency Are Not Caused by Increased Hepatic Conversion through Type I Deiodinase. *European Thyroid Journal*, 4(Suppl. 1). <https://doi.org/10.1159/000381021>

Wirth, E. K., Roth, S., Blechschmidt, C., Hölter, S. M., Becker, L., Racz, I., Zimmer, A., Klopstock, T., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Wurst, W., Naumann, T., Bräuer, A., De Angelis, M. H., Köhrle, J., Grüters, A., & Schweizer, U. (2009). Neuronal 3',3,5-triiodothyronine (T3) uptake and behavioral phenotype of mice deficient in Mct8, the neuronal T3 transporter mutated in Allan-Herndon-Dudley syndrome. *Journal of Neuroscience*, 29(30).

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6055-08.2009>

Wirth, E. K., Sheu, S. Y., Chiu-Ugalde, J., Sapin, R., Klein, M. O., Mossbrugger, I., Quintanilla-Martinez, L., Hrabě De Angelis, M., Krude, H., Riebel, T., Rothe, K., Köhrle, J., Schmid, K. W., Schweizer, U., & Grüters, A. (2011). Monocarboxylate transporter 8 deficiency: Altered thyroid morphology and persistent high triiodothyronine/thyroxine ratio after thyroidectomy. *European Journal of Endocrinology*, 165(4).

<https://doi.org/10.1530/EJE-11-0369>

Yen, P. M. (2001). Physiological and molecular basis of Thyroid hormone action. In *Physiological Reviews* (Vol. 81, Issue 3). <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1097>

Zada, D., Tovin, A., Lerer-Goldshtein, T., & Appelbaum, L. (2016). Pharmacological treatment and BBB-targeted genetic therapy for MCT8-dependent hypomyelination in zebrafish. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 9(11). <https://doi.org/10.1242/dmm.027227>

Zeitlin, P. L., Diener-West, M., Rubenstein, R. C., Boyle, M. P., Lee, C. K. K., & Brass-Ernst, L. (2002). Evidence of CFTR function in cystic fibrosis after systemic administration of 4-phenylbutyrate. *Molecular Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1006/mthe.2002.0639>

Zevenbergen, C., Meima, M. E., De Souza, E. C. L., Peeters, R. P., Kinne, A., Krause, G., Edward Visser, W., & Visser, T. J. (2015). Transport of iodothyronines by human I-type amino acid transporters. *Endocrinology (United States)*, 156(11).

<https://doi.org/10.1210/en.2015-1140>

Zung, A., Sonntag, N., Schweizer, U., Banne, E., & Braun, D. (2024). Glycerol Phenylbutyrate Treatment of 2 Patients With Monocarboxylate Transporter 8 Deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgae146>

Zwanziger, D., Schmidt, M., Fischer, J., Kleinau, G., Braun, D., Schweizer, U., Moeller, L. C., Biebermann, H., & Fuehrer, D. (2016). The long N-terminus of the human monocarboxylate transporter 8 is a target of ubiquitin-dependent proteasomal degradation which regulates protein expression and oligomerization capacity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 434. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.05.017>

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Bonn unter der Betreuung von Prof. Dr. Ulrich Schweizer und Dr. Doreen Braun durchgeführt. Das verwendete Mausmodell wurde mir in Kooperation mit Prof. Dr. Frédéric Flamant vom *Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon* zur Verfügung gestellt. Die tägliche Injektion der Versuchstiere über einen Zeitraum von bis zu drei Wochen wurde - nach einer anfänglichen Einführung durch Dr. Doreen Braun - von mir eigenständig durchgeführt. An Wochenenden erfolgten die Injektionen abwechselnd durch Dr. Doreen Braun und mich. Nach einer umfassenden Einarbeitung in die Methodik durch Dr. Doreen Braun und die Arbeitsgruppe übernahm ich selbstständig folgende experimentelle Arbeiten: Genotypisierung der Versuchstiere, Tötung der Tiere und Organentnahme, Bestimmung der Transaminasenaktivität im Serum, Aufbereitung des Gewebes für nachfolgende Analysen, Western Blots aus den Gewebeproben, Messung der Dejodase-1-Aktivität in Leber- und Nierengewebe mittels radioaktivem Enzymassay, RT-PCR in Leber- und Nierengewebe und Isolation von mRNA aus dem cerebralen Cortex der Versuchstiere für die 3'-mRNA-Sequenzierung. Die 3'-mRNA-Sequenzierung erfolgte durch die *Next Generation Sequencing Core Facility* der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn. Die bioinformatische Aufbereitung der Sequenzierdaten übernahm Prof. Ulrich Schweizer. Nach einer Einführung in die Methodik durch Dr. Doreen Braun, führte ich eigenständig die Untersuchungen zum Einfluss von NaPB auf die T₃- und T₄-Aufnahme in Zellkultur durch. Transfizierte MDCK1-Zellen wurden mir von Dr. Doreen Braun zur Verfügung gestellt. Zu den durchgeführten Arbeiten gehörten: Isolation primärer Astrozyten aus den Versuchstieren, Kultivierung der Astrozyten und MDCK1-Zellen, Behandlung der Zellen mit NaPB über sieben Tage, Nachweis der MCT8-Expression in MDCK1-Zellen durch Western Blot und Bestimmung der zellulären T₃- und T₄-Aufnahme in MDCK1-Zellen und Astrozyten mittels radioaktivem Transportassay. Die statistische Analyse und die Interpretation der Daten erfolgten zunächst mit Unterstützung von Dr. Doreen Braun, später zunehmend eigenständig. Versuche, die nicht selbstständig durchgeführt wurden, sind entsprechend gekennzeichnet.

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen aufrichtigen Dank an all diejenigen aussprechen, die mich während der Entstehung meiner Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Zunächst danke ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Ulrich Schweizer, für die Betreuung dieser Arbeit, seine freundliche Unterstützung während der Durchführung der Experimente und die konstruktiven Rückmeldungen bei der Korrektur dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, Dr. Doreen Braun, die mir in jeder Phase dieser Arbeit mit außergewöhnlicher Geduld, Fachkompetenz und Unterstützung zur Seite stand. Ihre herausragende Betreuung hat es mir ermöglicht, in diesem Projekt selbstständig zu arbeiten und ihre wertvolle Anleitung hat mich stets in die richtige Richtung geführt. Ohne ihr großes Engagement, ihren Einsatz für Details und ihr offenes Ohr für all meine Fragen und Anliegen wäre diese Dissertation in dieser Form nicht möglich gewesen.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an meine Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Schweizer, Uschi Reuter, Kristina Dorzweiler und Alexander Brohl, die mich bei der Einarbeitung in die Methodik unterstützten und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein tief empfundener Dank gilt auch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, Katharina Biermann und Wilko Helms, für ihre unerschütterliche Unterstützung während meines gesamten Studiums und meiner Promotion. Ihr bedingungsloser Rückhalt in allen Lebenslagen hat mir stets die nötige Stärke und den Mut gegeben, meinen Weg konsequent zu verfolgen.

Zuletzt möchte ich meinen Freunden danken, die mir in dieser intensiven Zeit stets zur Seite standen. Eure Freundschaft und euer Rückhalt bedeuten mir sehr viel.

Vielen Dank an alle, die mich auf diesem Weg begleitet haben!