

**Charakterisierung von TRIAC-Transportern und
Merkmale von Mausmodellen des
Allan-Herndon-Dudley-Syndroms**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (PhD)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Mandy Michelle GÜth-Steffens

aus Waldbröl

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Becker
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jens Mittag

Tag der Mündlichen Prüfung: 18.09.2025

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	10
1.1 Struktur und Funktion der Schilddrüse	10
1.1.1 Biosynthese der Schilddrüsenhormone	11
1.1.2 Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse	12
1.2 Transportproteine	13
1.2.1 Schilddrüsenhormon-spezifische Transportproteine	14
1.3 Allan-Herndon-Dudley Syndrom	18
1.4 Neuronale Entwicklungsstörung und beeinträchtigter Hormontransport	20
1.5 Behandlungsmöglichkeiten	23
1.5.1 3,5,3'-Trijodthyroessigsäure	25
1.5.2 3,3',5,5'-Tetraiodthyroessigsäure	27
1.5.3 3,5-Dijodthyropropionsäure und Sobetrome	27
1.6 Ziele der Arbeit	28
1.6.1 Charakterisierung und Identifizierung des 3,5,3'-Trijodthyroessigsäure (TRIAC) -Transporters	28
1.6.2 Charakterisierung von Mct8-Mausmodellen mit Missensmutation	29
2 Material und Methoden	30
2.1 Material	30
2.1.1 Verbrauchsmaterial und Reagenziensysteme	30
2.1.2 Geräte, Software und Datenbank	31
2.2 Methoden	33
2.2.1 siRNA-Screening potenzieller TRIAC-Kandidatengene	33
2.2.2 Transformation der Kandidatengene in XL1-Blue Bakterien	34

2.2.3 DNA-Midi-Präparation	36
2.2.4 Restriktionsanalyse	36
2.2.5 Sequenzierung	37
2.2.6 Zellkulturmethoden und Bedingungen	38
2.2.7 Einfrieren und Auftauen von Zellen	38
2.2.8 Stabile Transfektion von MDCK1-Zellen	39
2.2.9 Selektion stabil transfizierter MDCK1-Zellen mit Selektionsmedium	40
2.2.10 Isolierung von Zellklonen	40
2.2.11 Ernten von Zellen	40
2.2.12 Bradford-Assay	41
2.2.13 Western-Blot mit stabil transfizierten MDCK1-Zellen	42
2.2.14 Serielle Verdünnung und Generierung einer homogene Zelllinie	45
2.2.15 Immunfärbung und Zellzählung	45
2.2.16 Bestimmung der Zellzahl und Aufnahme-Assay Vorbereitungen	48
2.2.17 Adsorptionschromatografie von radioaktiven-Jodverbindungen	49
2.2.18 Endpunkt-Assay, sowie Zeit- und Konzentrationsabhängiges ¹²⁵ I-TRIAC Aufnahme-Assay	50
2.3.1 Merkmale von Mausmodellen des Allan-Herndon-Dudley-Syndroms	51
2.3.2 Präparation von Mäusen zur Durchführung von immunhistologischen Experimenten zum MCT8-Defekt	52
2.3.3 Genotypisierung und DNA-Verdau	53
2.3.4 Immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten	55
2.3.5 Isolierung spezifischer Gehirnregionen	57
2.3.6 RNA-Isolierung	58
2.3.7 RNA-Gel	59
2.3.8 cDNA-Synthese	59

2.3.9 Quantitative Echtzeit-PCR	60
3 Ergebnisse	62
3.1 Charakterisierung von TRIAC-Transportern	62
3.1.1 siRNA-Screening potenzieller TRIAC-Kandidatengene	62
3.1.2 Generierung von Überexpressionsklonen zu den jeweiligen Kandidatengenen	63
3.1.3 Detektion von <i>SLC29A2/ENT2</i> , <i>SLC22A9/OAT7</i> und <i>ABCD1/ALDP</i> im Western-Blot	66
3.1.4 <i>SLC29A2/ENT2</i> und <i>SLC2A9/OAT7</i> werden an der Plasmamembran von MDCK1-Zellen exprimiert	67
3.1.5 <i>SLC29A2/ENT2</i> und <i>SLC22A9/OAT7</i> sind Transportproteine für ¹²⁵ I-TRIAC	72
3.1.6 Das ¹²⁵ I-TRIAC-Aufnahme-Assay kann durch Erhöhung der Substratkonzentration in Überexpressionsklonen optimiert werden	76
3.1.7 <i>SLC22A9/OAT7</i> exprimierende Zellen zeigen eine Reduktion der ¹²⁵ I-TRIAC-Aufnahme bei Co-Inkubation mit nicht-radioaktivem Sobetirome und DITPA	79
3.1.8 <i>SLC22A9/OAT7</i> ist ein schwacher ¹²⁵ I-TETRAC-Transporter	81
3.2 Merkmale von Mausmodellen des Allan-Herndon-Dudley-Syndroms	84
3.2.1 <i>Mct8</i> ^{L223R/y} Mäuse zeigen eine signifikante Gewichtsreduktion im Vergleich zu <i>Mct8</i> ^{+/y} Mäuse	84
3.2.2 <i>Mct8</i> ^{L223R/y} Mausmutanten weisen eine signifikant Parvalbumin und Calbindin Reduktion im Vergleich zu <i>Mct8</i> ^{+/y} Mäusen auf	90
3.2.3 <i>Mct8</i> ^{L223R/y} Mausmutanten zeigen eine verringerte <i>Mct8</i> und <i>Aldh1a1</i> Expression im Gehirn, sowie eine erhöhte <i>Dio1</i> -Expression in der Leber und Niere	107
3.2.4 <i>Mct8</i> ^{P253L/y} ; <i>Oatp1c1</i> ^{-/-} Mäuse zeigen eine signifikante Gewichtsreduktion im Vergleich zu <i>Mct8</i> ^{+/y} Mäusen	111
3.2.5 <i>Mct8</i> ^{P253L/y} ; <i>Oatp1c1</i> ^{-/-} Mäuse zeigen eine signifikante Reduktion von Parvalbumin, Myelin und dem Perinneuronalen Netz, während Caretinin im Vergleich zu <i>Mct8</i> ^{+/y} Mäusen erhöht ist	113

4 Diskussion	120
4.1 Identifikation und Validierung von <i>SLC29A2/ENT2</i> und <i>SLC22A9/OAT7</i> als ¹²⁵ I-TRIAC-Transporter mit Optimierung der Transportaktivität	120
4.1.1 Fazit zur Charakterisierung der TRIAC-Transporter	123
4.1.2 Ausblick zur Charakterisierung der TRIAC-Transporter	124
4.2 Merkmale von Mausmodellen des Allan-Herndon-Dudley-Syndroms	124
4.2.1 <i>Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}</i> Mäuse zeigen den potenziell stärksten neurologischen Phänotyp und eine signifikante Reduktion von WFA als PNN Marker	125
4.2.2 Fazit zu den Merkmalen von Mausmodellen mit Allan-Herndon-Dudley-Syndrom	128
4.2.3 Ausblick zu den Merkmalen von Mausmodellen mit Allan-Herndon-Dudley-Syndrom	131
5 Zusammenfassung	132
5.1 Charakterisierung von TRIAC-Transportern	132
5.1.1 Characterization of TRIAC-Transporters	133
5.2 Merkmale von Mausmodellen des Allan-Herndon-Dudley-Syndroms	133
5.2.1 Features of Maus models for Allan-Herndon-Dudley syndrome	135
6 Abbildungsverzeichnis	136
7 Tabellenverzeichnis	141
8 Literaturverzeichnis	143
9 Danksagung	156

Abkürzungsverzeichnis

AHDS	Allan-Herndon-Dudley Syndrome	Allan-Herndon-Dudley-Syndrom
Aldh1a1	Aldehyde dehydrogenase 1 family, A1	Aldehyddehydrogenase 1 Familie, A1
ANOVA	Analysis of Variance	Varianzanalyse
BFD	Barrel field	Barrel-Feld
BMI	Body Mass Index	Körpermasseindex
CB	Calbindin	Calbindin
CR	Calretinin	Calretinin
CSPG	Chondroitin sulfate proteoglycan	Chondroitinsulfat-Proteoglykan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	Diamidino-2-phenylindol
Dio1,2,3	Deiodinase type 1,2,3	Dejodase Typ 1,2,3
DIT	Diiodotyrosine	Dijodtyrosin
DITPA	3,5-Diiodothyreopropionic acid	3,5-Dijodthyreopropionsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide solution	Dimethylsulfoxid-Lösung
DNA	Deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate	Desoxynukleotid-Triphosphat
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Ethylenediamin-tetraessigsäure
E3S	Estrone-3-sulfate	Estron-3-Sulfat
FCS	Fetal calf serum	Fetales Kälberserum
5'dFUR	50-deoxy-5-fluorouridine	50-desoxy-5-fluorouridin
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	Gliales fibrilläres saures Protein
HAT	Histone Acetyl Transferase	Histon-Acetyl-Transferasen
HAPLN	Hyaluronan and Proteoglycan-link Protein	Hyaluronan und Proteoglykan Verbindungsprotein
HDAC	Histone deacetylases	Histon-Desacetylasen
HPT	Hypothalamic pituitary thyroid axis	Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse

HSPG	Heparan sulfate proteoglycan	Heparansulfat-Proteoglykan
LT4	levothyroxine	levothyroxin
MCT8	Monocarboxylate transporter 8	Monocarboxylat-Transporter 8
MFS	Major-Facilitator-Superfamily	Haupt-Facilitator-Superfamilie
MIT	Monoiodotyrosine	Monojodtyrosin
mRNA	Messenger ribonucleic acid	Boten-Ribonukleinsäure
NaPB	Sodium phenylbutyrate	Natrium-Phenylbutyrat
NBTI	S- (4-nitrobenzyl)-6- thioinosine	S- (4-nitrobenzyl)-6- thioinosin
NeuN	Neuronal Nuclei	Neuronaler Nukleus
NIS	Sodium/ Iodide Symporter	Natrium-/ Jodid-Symporter
OATP	organic anion transporting polypeptide	Organisches Anionen-transportierendes Polypeptid
PBS	Phosphate-Buffered Saline	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerase-Kettenreaktion
pLDDT	The predicted local distance difference test	Test zur Vorhersage lokaler Abstandsdifferenzen
PTU	Propylthiouracil	Propylthiouracil
PV	Parvalbumin	Parvalbumin
RNA	ribonucleic acid	Ribonukleinsäure
RXR	retinoic X receptor	Retinoic-X-Rezeptor
SHBG	Sex hormone-binding globulin	Sexualhormon-bindendes Globulin
Ssp	Primary somatosensory cortex	Primärer somatosensorischer Kortex
T3	Triiodothyronine	Trijodthyronin
T4	Tetraiodothyronine	Tetrajodthyronin
TBG	Thyroxine-binding globulin	Thyroxin-bindendes Globulin
TETRAC	3,5,3',5'-Tetraiodothyroacetic acid	3,5,3',5'-Tetrajodthyroessigsäure
TH	Thyroid hormon	Schilddrüsenhormon
TLS	Translation start site	Translationsstartstelle
TPO	thyroid peroxidase	Schilddrüsenperoxidase
TR	Thyroid hormone receptor	Schilddrüsenhormonrezeptor
TRE	thyroid hormone response element	Schilddrüsenhormon Reaktionselement

TRH	Thyrotropin releasing hormone	Thyreotropin Releasing-Hormon
TRIAC	3,3',5-Triiodothyroacetic acid	3,3',5-Trijodthyroessigsäure
TSH	Thyroid-stimulating hormone	Schilddrüsen-stimulierendes Hormon
WFA	<i>Wisteria floribunda</i> agglutinin	<i>Wisteria floribunda</i> Agglutinin

1 Einleitung

1.1 Struktur und Funktion der Schilddrüse

Die Schilddrüse ist ein endokrines Organ, bestehend aus einem rechten (Lobus dexter) und linken Lappen (Lobus sinister), welche über den Isthmus miteinander verbunden sind (Abb. 1). Anatomisch ist die Schilddrüse ventral-lateral der Trachea lokalisiert und umschließt die vordere Luftröhre unterhalb des Larynx (Armstrong et al., 2024). Die Blutversorgung der Schilddrüse erfolgt insbesondere über die Arteria thyroidea superior, sowie Arteria thyroidea inferior, welche über Anastomosen miteinander verbunden sind (Beynon & Pinneri, 2016). Auf histologischer Ebene besteht die Schilddrüse aus Follikeln, die aus Follikelepithelzellen aufgebaut sind (Khan & Farhana, 2024). Follikel sind kugelförmige Hohlraumstrukturen, welche ein aus Thyreoglobulin bestehendes Kolloid enthalten (Abb. 1) (Beynon & Pinneri, 2016). Die zwischen den Follikeln liegenden parafollikulären Zellen (C-Zellen) produzieren und sezernieren Kalzitonin und sind zudem an der Kalziumhomöostase beteiligt (Beynon & Pinneri, 2016).

Funktionell dient die Schilddrüse der Produktion und Ausschüttung der Prohormone 3,3', 5-Trijodthyronin (T3), sowie 3,3',5,5'-Tetraiodthyronin (T4) (Khan & Farhana, 2024). Die Hormone sind an der Thermogenese, Wachstum und Entwicklung von Organen, wozu insbesondere das zentrale Nervensystem gehört, beteiligt. Überdies regulieren diese auch den Energie-, Kohlenhydrat-, Protein- und Fettstoffwechsel. Im zirkulierenden Blut sind Schilddrüsenhormone überwiegend an Bindungsproteine wie Transthyretin, thyroxinbindendes Globulin (TBG) und Albumin gebunden (Armstrong et al., 2024). Zudem reguliert das Schilddrüsenhormon T3 die Genexpression T3-abhängiger Gene.

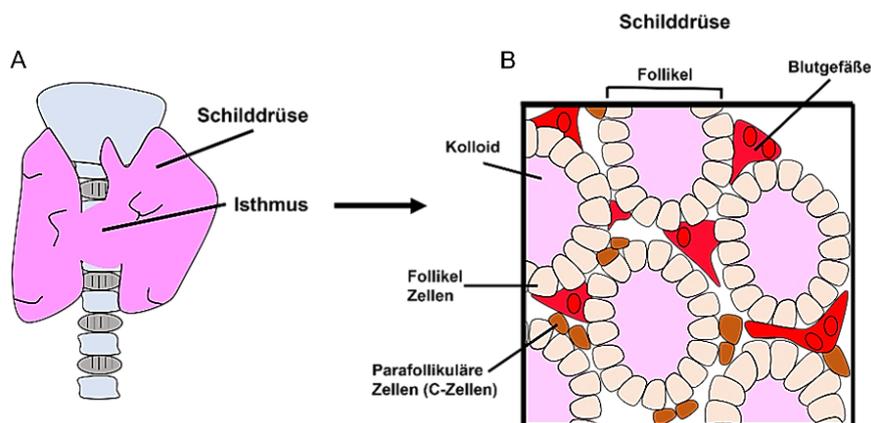


Abbildung 1: Schematische Darstellung der anatomischen und molekularen Struktur der Schilddrüse. Die Schilddrüse befindet sich ventral-lateral der Trachea (A) und besteht aus Follikeln, welche mit einem Kolloid gefüllt sind (B). Zwischen den Follikeln sind Parafollikuläre Zellen (C-Zellen) lokalisiert (B) (adaptiert nach The Thyroid Gland - The Endocrine System - Medical Physiology, 2e Updated Edition: with Student Consult Online Access, 2e (Medical Physiology (Boron)) 2nd Ed., o. J.).

1.1.1 Biosynthese der Schilddrüsenhormone

Im Blutkreislauf zirkuliert Jodid (I^-), welches für die Schilddrüsenhormonsynthese unerlässlich ist. Dieses wird über Na^+/I^- -Symporter (NIS) transportiert, die sich auf der basolateralen Plasmamembran der Follikelzellen befinden (Mansourian, 2011) (Abb. 2). Jodid wird dann durch die Schilddrüsenperoxidase (TPO) zu Jod oxidiert. Letzteres kann dann mittels TPO an die Tyrosinreste des Thyreoglobulin (TG) gebunden werden, wodurch Monojodtyrosin (MIT/T1) und Dijodtyrosin (DIT/T2) synthetisiert werden können (Khan & Farhana, 2024). Danach induziert die Schilddrüsenperoxidase (TPO) die Synthese von T4 oder T3 aus MIT und DIT (Mansourian, 2011) (Abb. 2). Anschließend erfolgt eine Endozytose in die Follikelzellen mit anschließender Freisetzung der Schilddrüsenhormone T3 und T4 in den Blutkreislauf, wo diese dann an Bindungsproteine, wie dem Thyroid-bindenden-Globulin (TGB), Transthyretin und Albumin gebunden werden können (Khan & Farhana, 2024).

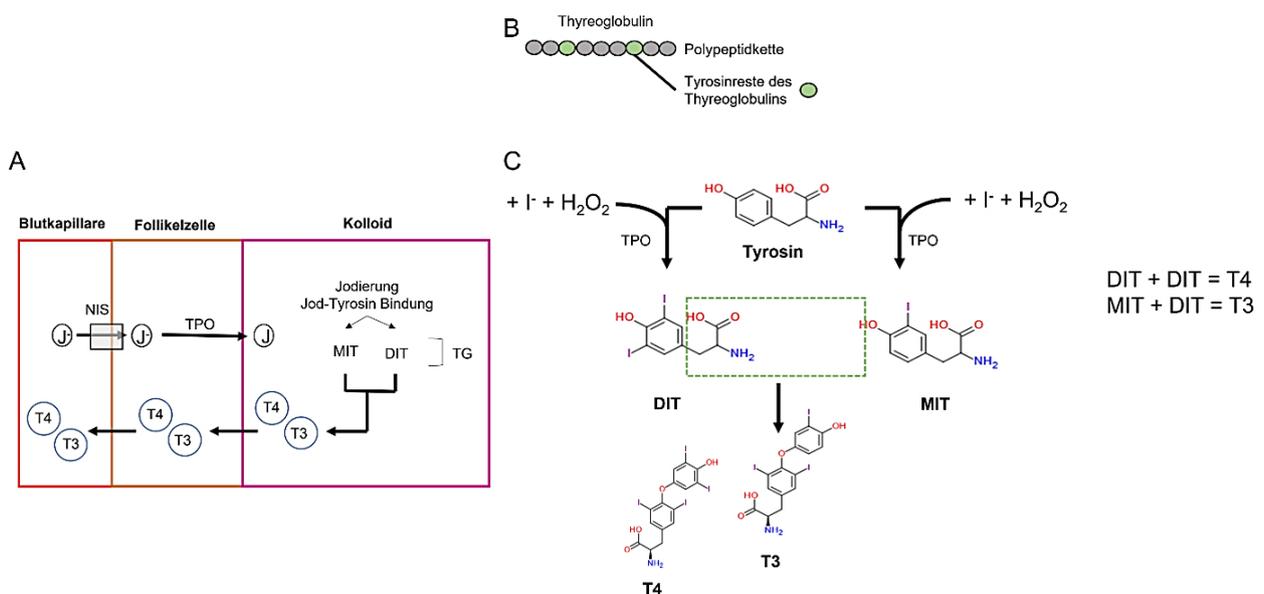


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Biosynthese und Charakterisierung von 3,3',5-Trijodthyronin (T3), sowie 3,3',5,5'-Tetraiodthyronin (T4). Zur Synthese der Hormone ist zunächst die Aufnahme und Oxidierung von Jodid mittels der Schilddrüsenperoxidase (TPO) notwendig (A). Im follikulären Lumen wird dies dann an Tyrosinreste des Thyreoglobulins gebunden (A, B). Folglich können Monojodtyrosin (MIT) und Dijodtyrosin (DIT) synthetisiert werden, sowie durch deren gemeinsame Anlagerung T4 und T3 generieren (A, C). Im weiteren Verlauf können T4 und T3 aus den Follikeln in den Blutkreislauf freigesetzt werden. Strukturell bestehen die Schilddrüsenhormone T3 und T4 aus einem äußeren und inneren Benzolring (C). T4 besitzt vier Jodatome, wohingegen T3 in seiner biologisch aktiven Form drei Jodatome besitzt (C) (adaptiert nach Khan & Farhana, 2024).

1.1.2 Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse

Die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse (HPT) fungiert als Regulierungssystem, welches mittels Rückkopplungsmechanismen reguliert wird (Feldt-Rasmussen et al., 2021) (Abb. 3). Im Detail wird das Thyreotropin-freisetzende-Hormon (TRH) im paraventriculären Nucleus (PVN) des Hypothalamus produziert und nach Freisetzung über das Pfortadersystem zum Hypophysenvorderlappen transportiert. Dort bindet TRH an den TRH-Rezeptor des Hypophysenvorderlappens, wodurch das Schilddrüsen-stimulierende Hormon (TSH) freigesetzt wird (Feldt-Rasmussen et al., 2021). TSH wird dann über den Blutkreislauf zur Schilddrüse transportiert und induziert dort die Freisetzung von T4 und T3 aus dem Kolloid der Schilddrüse. T4 und T3 passieren über spezifische Transportproteine, zu welchen das organische Anionen-transportierende Polypeptid 1C1 (OATP1C1) und der Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) gehören, die Blut-Hirn-Schranke. Die Aufrechterhaltung einer normalen Schilddrüsenfunktion ist von einem negativen Rückkopplungsmechanismus abhängig (Feldt-Rasmussen et al., 2021). Die Rückkopplungsmechanismen wirken zwischen der Hypophyse, Hypothalamus und der Schilddrüse. Insbesondere T3 kann hierbei die TRH- und TSH-Freisetzung aus dem Hypothalamus und der Hypophyse über einen negativen Rückkopplungsmechanismus regulieren (Feldt-Rasmussen et al., 2021).

Eine Mutation im MCT8-Transportprotein führt dazu, dass T3 nicht hinreichend über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn gelangen kann. Dies induziert die erhöhte Freisetzung von TRH aus dem Hypothalamus mit nachfolgender Stimulation des Hypophysenvorderlappens und anschließender TSH-Freisetzung (Müller & Heuer, 2012).

Danach werden T3 und T4 von der Schilddrüse freigesetzt. Bei einer Mutation im MCT8-Transportprotein kann keine hinreichende negative Rückkopplung erfolgen, wodurch T3 im Körper akkumuliert. Folglich resultiert eine periphere Thyrotoxikose, während im Gehirn vorwiegend ein T3-Mangel besteht (Müller & Heuer, 2012).

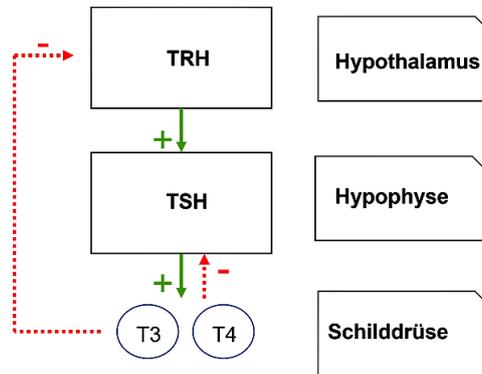


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse (HPT). Das Thyreotropin-freisetzende-Hormon (TRH) wird im paraventriculären Kern von hypophysiotropen Neuronen im Hypothalamus freigesetzt. TRH stimuliert dann die Sekretion des Schilddrüsen-stimulierenden Hormons (TSH) im Hypophysenvorderlappen. TSH kann dann über den Blutkreislauf zur Schilddrüse transportiert werden und dort die Freisetzung von 3,3', 5-Trijodthyronin (T3) und 3,3',5,5'-Tetraiodthyronin (T4) induzieren. Eigene Darstellung.

1.2 Transportproteine

Zellen benötigen spezifische Konzentrationen von Molekülen und Ionen, welche sowohl innerhalb der Zellen als auch außerhalb der Zellmembran vorhanden sein müssen. Um diese Konzentration aufrechtzuerhalten, bestehen sowohl passive als auch aktive Transportmechanismen. Zudem bestehen unterschiedliche Transportertypen, zu welchen die Antiporter, Symporter und Uniporter gehören (Sauve et al., 2023). Diese unterscheiden sich hinsichtlich der Transportrichtung von Substraten, als auch bezüglich der Menge der transportierbaren Substrate. Strukturell sind Transportproteine polytopisch und ermöglichen den Stoffaustausch in lebenden Systemen. Strukturell bestehen Transportproteine aus transmembranen, sowie diskontinuierlichen α -helicalen Segmenten (TMS), welche hydrophob miteinander verbunden sind (Sauve et al., 2023). Es bestehen sowohl kovalent als auch nicht kovalente Bindungen innerhalb eines Proteins. Die hydrophoben Wechselwirkungen erfolgen hierbei zwischen den

hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren und tragen zur Stabilisierung der Proteinstruktur bei. Transportproteine weisen eine dreidimensionale Struktur bestehend aus einer Sekundärstruktur und Tertiärstruktur auf, welche essenziell für die physiologischen Eigenschaften eines Transportproteins sind. Transportproteine haben zudem oft intra- und extrazelluläre Schleifen, sowie zytoplasmatisch lokalisierte N- und C-terminale Regionen. Diese sind für die Struktur, Funktion und Verankerung des Transportproteins in der Plasmamembran wichtig. Moleküle wie T3 und T4 können von spezifischen Transportproteinen erkannt und durch die Zellmembran transportiert werden. Aminosäurereste interagieren mit spezifischen Substraten und katalysieren so deren Translokation über intrahelikale Wechselwirkungen (Sauve et al., 2023). Zudem ermöglichen Transportproteine den Übergang von Substraten durch die Membran mittels des „rocker-switch“ Prinzip (Diallinas, 2014). Hierbei kann das Substrat an der extrazellulär lokalisierten Bindestelle binden, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt. Die extrazelluläre Bindestelle wird geschlossen und die extrazelluläre Topologie ändert sich. Danach öffnet sich das Transportprotein intrazellulär, wodurch das Substrat ins Zellinnere gelangen kann. Die extrazelluläre und intrazelluläre Bindestelle des Transporters können nicht gleichzeitig geöffnet sein, wodurch eine gerichtete Bewegung des Substrats entsprechend dem „rocker-switch“ Prinzip ermöglicht wird (Diallinas, 2014). Die Bindestellen von Transportproteinen sind zudem substratspezifisch, während die Transportaktivität dem Prinzip der Michaelis-Menten-Kinetik folgt, welches durch die Substrataffinität und die maximale Transportrate charakterisiert werden kann. Die Substratspezifität und Affinität variiert zwischen Transportproteinen.

1.2.1 Schilddrüsenhormon-spezifische Transportproteine

Schilddrüsenhormone wie T3 und T4 benötigen spezifische Transportproteine, um in die Zelle zu gelangen. Derzeit sind 16 verschiedene Transporter für Schilddrüsenhormone innerhalb mehrerer Proteinfamilien bekannt (Groeneweg et al., 2020). Hierbei stellen insbesondere die Schilddrüsenhormontransporter, organische Anionen-transportierende Polypeptid 1C1 (OATP1C1) und der Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) wichtige Transportproteine dar (Abb. 4). Die Transportmechanismen können in einen aktiven und

passiven Transport unterteilt werden (Groeneweg et al., 2020). Bei einem passiven Transport wird das Molekül entlang eines Konzentrationsgradienten transportiert, während bei einem aktiven Transport Moleküle entgegen einem Konzentrationsgradienten transportiert werden. Sowohl MCT8 als auch OATP1C1 benötigen kein ATP, für den Transport ihrer jeweiligen Substrate (Groeneweg et al., 2020). Diese sind zudem vorwiegend an der Plasmamembran lokalisiert und substratspezifische Carrier-Transporter.

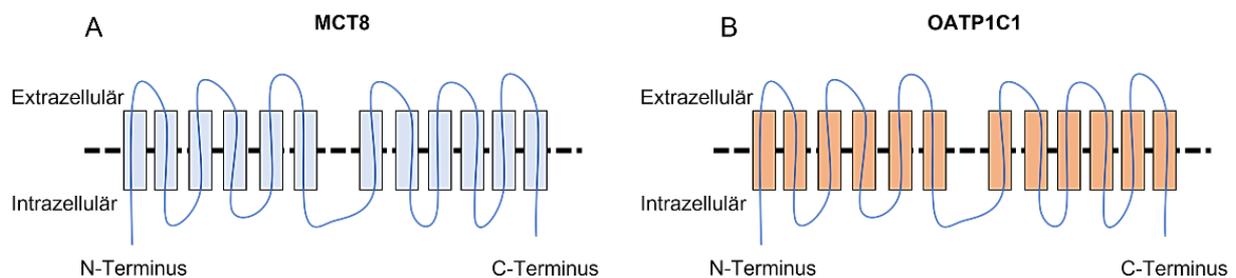


Abbildung 4: Schematische Darstellung des MCT8- (A) und OATP1C1-Transportproteins (B). Beide Transportproteine besitzen einen intrazellulär lokalisierten N- und C-Terminus, sowie je 12 α -helicalen Segmenten (TMS), welche über hydrophobe Wechselwirkungen miteinander verbunden sind (A, B). Eigene Darstellung.

Der OATP1C1 (chromosomale Lokalisierung auf 12p12) Transporter gehört der Solute Carrier organic anion Transporter (SLCO) Familie an und kann Moleküle wie T4 transportieren. Strukturell haben OATP1C1-Transporter 12 Transmembranhelices (THM), sowie einen intrazellulär lokalisierten C-Terminus und N-Terminus. Das organische Anionen-transportierende Peptid (OATP) ist ein MCT8-unabhängiger bidirektionaler Transporter (Groeneweg et al., 2020; Strømme et al., 2018). Das *SLCO1C1*-Gen kodiert für den OATP1C1-Transporter, welcher vorwiegend in den Endothelzellen der Blut-Hirnschranke exprimiert wird (Groeneweg et al., 2020). OATP1C1 besitzt als organischer Anionentransporter eine hohe Spezifität und Affinität für das inaktive Vorläuferhormon T4, welches unter physiologischen Bedingungen partiell negativ geladen ist (Groeneweg et al., 2020; Strømme et al., 2018).

Das MCT8-Transportprotein besitzt hingegen eine Major Facilitator Superfamily (MFS) Faltung (Groeneweg et al., 2020). Transportproteine mit MFS-Faltung weisen 12 transmembrane α -Helixbündel auf. Die transmembranen α -Helixbündel 1-6 sind über eine intrazelluläre Schleife mit den transmembranen α -Helixbündel 7-12 verbunden. Hierbei

sind sowohl der C-Terminus als auch der N-Terminus intrazellulär lokalisiert. Die Bindung sowie der Transport der Schilddrüsenhormone erfolgt über eine gegeneinander ausführende Rotationsbewegung der Helices, sowie Veränderung der Konformation entsprechend dem „rocker-switch“ Prinzip (Groeneweg et al., 2020; Sauve et al., 2023). Ein funktionierender Schilddrüsenhormontransport und eine damit einhergehende Homöostase ist für den menschlichen Körper und dessen Entwicklung unerlässlich. Das *SLC16A2*-Gen kodiert für das bidirektionale MCT8-Transportprotein, welches insbesondere am zellulären Import sowie Export von Schilddrüsenhormonen beteiligt ist (Thomas et al., 2023). Das *MCT8*-Gen besteht aus sechs Exons, sowie fünf Introns (Protze et al., 2017; Schweizer et al., 2014). Zudem besitzt das *SLC16A2*-Gen zwei Translationsstartstellen (TLS). In Abhängigkeit der verwendeten TLS gibt es vom menschlichen MCT8-Protein zwei unterschiedliche Isoformen, welche aus 613 oder 539 Aminosäuren (AS) bestehen können (Groeneweg et al., 2020). MCT8 gehört zur Familie der Monocarboxylat-Transporter (MCT), welche vorwiegend in der Schilddrüse, Leber, Niere und im Gehirn lokalisiert sind. Innerhalb des Gehirns wird MCT8 vorwiegend in Gliazellen, Astrozyten, Oligodendrozyten, Neuronen, sowie in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke exprimiert (Heuer et al., 2005.; van Geest et al., 2021). MCT8 ist als Schilddrüsenhormontransporter für L-Enantiomere spezifisch. Enantiomere sind Stereoisomere, die sich wie Spiegelbilder zueinander verhalten und nicht durch Drehung zur Deckungsgleichheit gebracht werden können. MCT8-Transportproteine haben eine hohe Affinität für das biologisch aktive Schilddrüsenhormon T3. OATP1C1 und MCT8 sind sowohl neuronal als auch im peripheren Gewebe lokalisiert und unterscheiden sich hinsichtlich der Bindungsaffinität zu den jeweiligen Schilddrüsenhormonen (Groeneweg et al., 2020). T3 kann dann als biologisch aktives Schilddrüsenhormon am nukleären T3-Rezeptor binden und die Transkription Schilddrüsen-relevanter Gene regulieren (Abb. 5) (van Geest et al., 2021). Es besteht eine Vielfalt an T3-abhängigen Genen in unterschiedlichen Organen, zu welchen innerhalb der Leber *Dio1*, *Gsta2* und *Ucp2* gehören, sowie *Hcn2*, *Atp2a2*, *Myh6* und *Myh7* im Herzen (Bárez-López et al., 2019; Morte et al., 2018). Insbesondere *Hr*, *Klf9*, *Dpb*, *Cbr2*, *Flywch2*, *Dio3* und *Aldh1a1* weisen eine T3-abhängige Genexpression im Gehirn auf (Bárez-López et al., 2019; Morte et al., 2018). *Myh6/Myh7* sind für eine physiologische Herzmuskelkontraktion essenziell. In diesem Kontext können Veränderungen in der Genexpression kardiovaskuläre

Erkrankungen begünstigen. *Klf9* ist ein Transkriptionsfaktor, welcher insbesondere an der neuronalen Differenzierung und Plastizität des Gehirns beteiligt ist, während *Hr* zu einer physiologischen Entwicklung und Funktion des zentralen Nervensystems beiträgt. *Aldh1a1* ist vorwiegend an der Oxidation von toxischen Aldehyden zu Carbonsäuren beteiligt und wird im Gehirn ubiquitär exprimiert. *Ucp2* ist hingegen ein T3-abhängiges Gen, welches mit der Energie- und Wärmeproduktion des Körpers korreliert.

Weiterhin können Schilddrüsenhormone mittels Jodthyronin-Dejodinasen, welche zu den Selenoenzymen gehören, dejodiert werden. T4 kann mittels Dejodase-2 und Dejodase-1 (Dio2/Dio1) in das biologisch aktive T3 umgewandelt werden und über Dejodase-3 (Dio3), sowie einer Dejodierung an 5 Position des inneren Benzolrings in das biologisch inaktive reverse-T3 (rT3) dejodiert werden, während T3 durch eine weitere Dejodierung an 5' Position des äußeren Benzolrings zu T2 dejodiert werden kann (van Geest et al., 2021). Das inaktive Vorläuferhormon T4 wird nach Aufnahme in die Zelle mittels 5'-Dejodase (Dio 2) an der 5' Position des äußeren Benzolrings dejodiert und in das biologisch aktive Schilddrüsenhormon T3 metabolisiert (Abb. 5). Hierbei liegt der T3-Rezeptor als Heterodimer mit dem Retinoic X-Rezeptor (RXR) vor, welcher am Schilddrüsenhormon-responsives Element (TRE) gebunden ist (Armstrong et al., 2024; Beynon & Pinneri, 2016). Ein Co-Repressor und die mit diesem assoziierten Histon-Deacetylasen (HDACs) verhindern die Transkription T3-abhängiger Gene. Die Bindung von T3 am nukleären T3-Rezeptor induziert eine Konformationsveränderung. Hierbei lagern sich Co-Aktivatoren und die damit verbundenen Histon-Acetyl-Transferasen (HATs) an, wodurch Acetylgruppen auf die Lysinreste der Histone übertragen werden können und die DNA für Transkriptionsfaktoren zugänglich wird (Abb. 5) (Armstrong et al., 2024; Beynon & Pinneri, 2016). Nachfolgend kann die Transkription von Schilddrüsenhormon-abhängigen Genen mittels RNA-Polymerase III reguliert werden. Die unterschiedlichen Isoformen des T3-Rezeptors führen dazu, dass unterschiedliche Gene exprimiert werden können (Armstrong et al., 2024; Beynon & Pinneri, 2016).

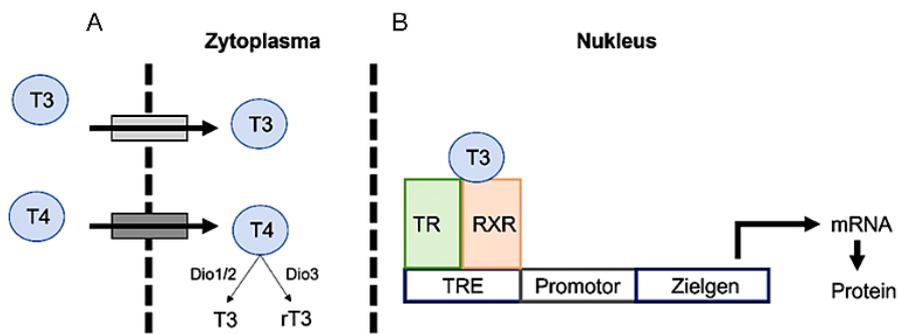


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Transportproteine und Wirkung von Schilddrüsenhormonen. Die Schilddrüsenhormone 3,3',5'-Trijodthyronin (T3) und 3,3',5,5'-Tetraiodthyronin (T4) gelangen über Schilddrüsenhormontransporter in die Zelle und können nachfolgend metabolisiert werden (A). Die Jodthyronin-Dejodinasen (Dio1, Dio2, Dio3) katalysieren die Dejodierung von Schilddrüsenhormonen (A). Nach erfolgter Dejodierung von T4 zu T3, kann das biologisch aktive T3 in den Nukleus gelangen und dort am nukleären T3 Schilddrüsenrezeptor (TR) binden, welcher ein Heterodimer mit dem Retinoic-X-Rezeptor (RXR) am Schilddrüsenhormon-responsives Element (TRE) innerhalb der T3-Promotorregion bildet (B). Nachfolgend wird die Expression von T3-abhängigen Genen stimuliert (adaptiert nach Groeneweg et al., 2020). Eigene Darstellung.

1.3 Allan-Herndon-Dudley Syndrom

Das Allan-Herndon-Dudley-Syndrom (AHDS) ist eine seltene genetische Erkrankung, welche mit einer reduzierten Lebenserwartung des Patienten einhergeht (Dumitrescu et al., 2004) (OMIM 300523). Die Erkrankung betrifft nur männliche Patienten, während Frauen Konduktorinnen sind (Groeneweg et al., 2019, 2020). In der Literatur wird die geschätzte Prävalenz mit 1: 70.000 angegeben (Groeneweg et al., 2019, 2020). Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung ist die genaue Prävalenz jedoch noch nicht abschließend bestimmt. Ein Defekt im MCT8-Transportprotein ist auf eine Mutation im X-Chromosomal lokalisierten *SLC16A2*-Gen (Xq13.2) zurückzuführen, wodurch es zu einem Defekt im MCT8-Transportprotein kommt (Braun & Schweizer, 2014, 2020; Thomas et al., 2023). In diesem Kontext sind mehr als 100 Mutationen bekannt, welche zu einer Einschränkung der MCT8-Transportfähigkeit führen und somit eine klinische Relevanz besitzen (Braun & Schweizer, 2014, 2020; Thomas et al., 2023). In Abhängigkeit der Schwere der Mutation kann eine verbleibende Restaktivität des Transporters vorhanden sein.

MCT8 ist ein essenzielles Transportprotein für Schilddrüsenhormone. Ein Defekt im MCT8-Transportprotein führt folglich zu einer hormonellen Dysregulation in Patienten mit AHDS. Charakteristisch für diese Erkrankung ist eine Akkumulation von T3 im peripheren Gewebe, sowie eine erhöhte Serum-T3-Konzentration, wohingegen das Gehirn einen Mangel an T3-Hormonen zeigt. T4 und rT3 sind im Gehirn meist erniedrigt, während der TSH-Wert entweder dem physiologischen Normwert entspricht oder ebenfalls erniedrigt sein kann (Müller & Heuer, 2012) (Abb. 6). Folglich induziert der dysfunktionale Efflux von T3 eine symptomatische Hypothyreose im MCT8-abhängigen Gewebe, während MCT8-unabhängiges Gewebe eine chronische Thyreotoxikose aufweist (van Geest et al., 2021) (Abb. 6).

Patienten mit MCT8-Defekt weisen neurologische, kognitive und motorische Defizite sowie organspezifische Erkrankungen auf (Groeneweg et al., 2020; van Geest et al., 2021). Der Corpus Callosum, kortikale Projektionsneuronen, sowie Hirnstamm und Rückenmark weisen eine besonders hohe Myelindichte auf. Patienten mit MCT8-Defekt zeigen eine pathologische neuronale Entwicklung mit verzögerter und unvollständiger Myelinisierung von Axonen sowie eine Reduktion der weißen Hirnsubstanz (van Geest et al., 2021). Myelin ist für eine schnelle saltatorische Signalweiterleitung (100 m/s) essenziell und besitzt eine Schutzfunktion für Neuronen. Die neurologischen Beeinträchtigungen korrelieren mit einer prädominanten Sprachstörung, sowie geistiger Retardierung, mit potenziell in Erscheinung tretenden epileptischen Anfällen. Phänotypisch ist in Patienten eine ausgeprägte Muskelschwäche ersichtlich und ein daraus resultierendes Unvermögen der Kopfkontrolle (Müller & Heuer, 2012; van Geest et al., 2021). Zudem haben Patienten meist eine fortschreitende spastische Tetraplegie, verringerte Muskelmasse, Gelenkkontrakturen, sowie kardiovaskuläre Erkrankungen mit Hypertonie, tachykarden Herzrhythmusstörungen, Schmerzattacken und Schlafstörungen (Müller & Heuer, 2012; van Geest et al., 2021, 2022).

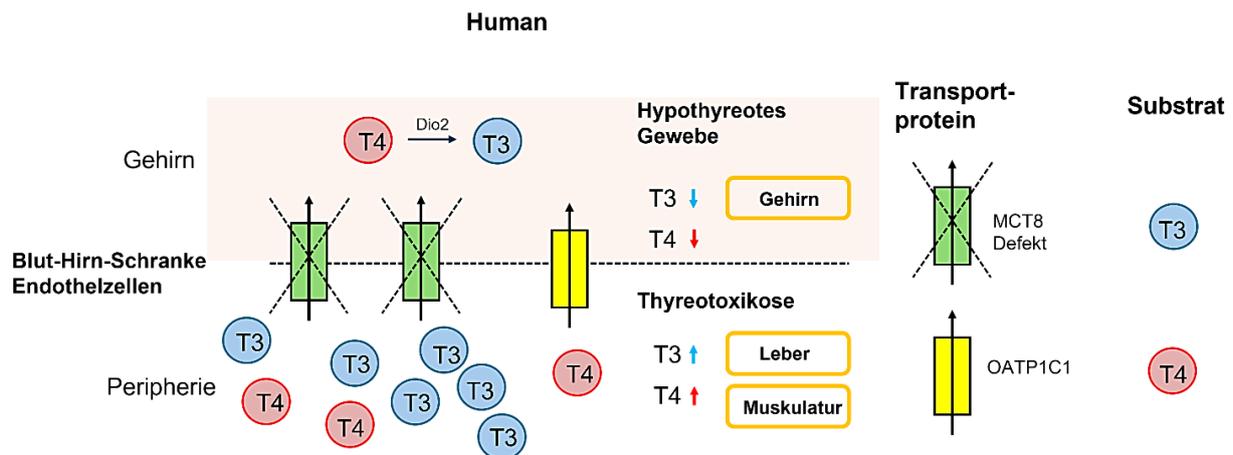


Abbildung 6: Schematische Darstellung der molekularbiologischen Pathologie von Patienten mit Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) Defekt. Ein Defekt im MCT8-Transportprotein resultiert in einer reduzierten Transportfähigkeit von 3,3',5-Trijodthyronin (T3) durch die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke und induziert eine Hypothyreose in MCT8-abhängigen Gewebe, wohingegen MCT8-unabhängiges Gewebe aufgrund der erhöhten T3-Konzentration thyreotoxisch wird. Der organische Anionen-transportierende Polypeptid 1C1 (OATP1C1) -Transporter ist weiterhin aktiv und transportiert T4 in das Gehirn, wo dieses mittels Dejodase-2 (Dio2) in T3 umgewandelt werden kann. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: Dio2; Dejodase-2 (adaptiert nach van Geest et al., 2021).

1.4 Neuronale Entwicklungsstörung und beeinträchtigter Hormontransport

MCT8 ist ein wichtiges Transportprotein für die Schilddrüsenhormonen-Homöostase im Gehirn. In diesem Kontext gewährleistet die physiologische Verteilung von T4 und T3 eine physiologische neuronale Entwicklung des Gehirns, sowie physiologische Migration von Neuronen, Dendritifizierung, Neuritenwachstum, Bildung von Synapsen, Myelinisierung und Modulation der Zellproliferation (Heuer et al., 2005; Kim et al., 2019; López-Espíndola et al., 2014). MCT8 ist innerhalb des Gehirns insbesondere im Hippocampus, Amygdala, Basalganglien, sowie Purkinje-Zellen lokalisiert (Heuer et al., 2005; Kim et al., 2019; López-Espíndola et al., 2014). Zudem wird MCT8 an der Plasmamembran von Neuronen, Oligodendrozyten, Gliazellen und Astrozyten exprimiert, wodurch T3 in die Zelle transportiert werden kann. Astrozyten stellen hierbei spezialisierte Gliazellen dar, welche an der Homöostase von Ionen, zu welchen Na^+ , H^+ , K^+ und Cl^- gehören, sowie der Regulierung des zerebralen Blutflusses, als auch des Hirnstoffwechsels beteiligt sind. Zudem sind diese für eine physiologische Energiespeicherung, Reduktion von oxidativem

Stress, synaptischen Modulation und Neurogenese essenziell (Kim et al., 2019; van Putten et al., 2021). Beeinträchtigungen hinsichtlich der Expression oder Funktion des MCT8-Transportproteins führen zu einer Reduktion von T3 im Gehirn. Dies ist nicht durch das Vorhandensein von OATP1C1-Transportern und dem damit einhergehenden Transport von T4 in das Gehirn kompensierbar (Abb. 7). Zur Untersuchung eines möglichen neurologischen Phänotyps bei bestehender Mct8-Punktmutation kann folglich die Generierung von Mausmodellen erforderlich sein, welche zuzüglich eine Oatp1c1-Defizienz (Oatp1c1^{-/-}) haben (Mayerl et al., 2012). Eine Mct8-Defizienz (Mct8^{-/-}) hingegen führt zu einem schwächeren neurologischen Phänotyp, da T4 immer noch ins Gehirn gelangen kann. Dies ist auf das Vorhandensein des T4-selektiven organischen Anionentransportierenden Polypeptid (OATP1C1) zurückzuführen (Mayerl et al., 2012).

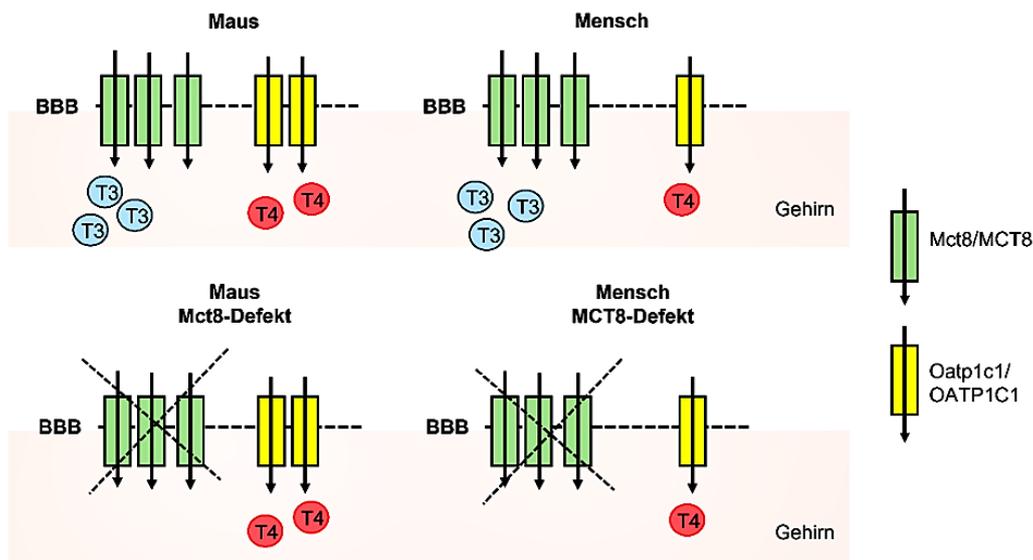


Abbildung 7: Schematische Darstellung hinsichtlich der Anzahl vorhandener OATP1C1-Transportproteine zwischen gesunden und MCT8^{-/-}-defizienten Menschen und Mäusen. 3,3',5-Trijodthyronin (T3) kann über den Blutkreislauf ins Gehirn gelangen. Ein MCT8-Defekt führt dazu, dass weniger T3 im Gehirn vorhanden ist. Das organische Anionentransportierende Polypeptid 1C1 (OATP1C1) -Transportprotein transportiert weiterhin 3,3',5,5'-Tetraiodthyronin (T4) über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn. Im Menschen werden jedoch weniger OATP1C1-Transporter exprimiert, wodurch im Menschen weniger T4 in T3 umgewandelt werden kann. In der Blut-Hirn-Schranke von Mäusen sind mehr OATP1C1-Transportproteine exprimiert, wodurch diese im Vergleich zum Menschen in Mausmodellen kompensatorisch wirken. Daraus resultierend ist der T3-Mangel im Gehirn von Mäusen weniger stark ausgeprägt, wodurch ein milder neurologischer Phänotyp vorhanden ist (adaptiert nach Grijota-Martínez et al., 2020). Eigene Darstellung.

Ein Mangel an Schilddrüsenhormonen im Gehirn führt zu einer verminderten Neurogenese, Zellmigration, neuronale Differenzierung, Synaptogenese, Myelinisierung des Gehirns, sowie affektiven und kognitiven Beeinträchtigungen (Grijota-Martínez et al., 2020; López-Espíndola et al., 2014). Ebenfalls führt die verminderte Aufnahme von T3 im Gehirn zu einer Veränderung der Gamma-Aminobuttersäure (GABA)-Interneuronen, welche an der Übertragung inhibitorischer Signale im Gehirn beteiligt sind. Zudem exprimieren die meisten GABAergen-Interneuronen das kalziumbindende Protein Parvalbumin (PV), welches an der Regulierung des Zellzyklus und Synthese von Neurotransmittern beteiligt ist (Gilbert et al., 2007). PV-positive Neuronen tragen zur Aufrechterhaltung von einem physiologischen Arbeitsgedächtnis, Neurokognition, sowie kognitiver Flexibilität bei. Infolge einer Hypothyreose des Gehirns wird diese Funktion beeinträchtigt (Braun et al., 2012; Gilbert et al., 2007). Das zentrale Nervensystem (ZNS) ist von einer extrazellulären Matrix (ECM) umgeben und stellt bei hoher Verdichtung das perineuronale Netz (PNN) dar. Eine Beeinträchtigung hinsichtlich der Zellzahl, Dichte und Expression von PV-positiven Neuronen kann zudem eine Veränderung des perineuronalen Netzes (PNNs) induzieren, welches vorwiegend inhibitorische GABAerge Parvalbumin-positive (PV) Interneuronen umgibt (Fawcett et al., 2022). Das PNN setzt sich insbesondere aus Chondroitinsulfat-Proteoglykane (CSPGs) zusammen, zu welchen Aggrecan, Neurocan, Brevican und Versican gehören. Ebenfalls wichtig für die Struktur des PNN sind Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs), Hyaluronan und Glykoproteine (Domowicz et al., 2008; Fawcett et al., 2022) (Abb. 8). Weitere Bestandteile des PNN sind Tenascine, welche Aggrecan, Neurocan, Versican und Brevican miteinander verbinden (Abb. 8). Hyaluronan and Proteoglycan-link (HAPLN) Proteine verbinden zudem die Proteoglykane mit dem Hyaluronan-Grundgerüst (Deepa et al., 2006). Das PNN umhüllt dann, insbesondere inhibitorische GABAerge Parvalbumin-positive (PV) Interneuronen und die pyrimidalen Zellen des Gehirns (Fawcett et al., 2022; Härtig et al., 2022). Hierbei sind vorwiegend das Soma sowie die proximalen Dendriten synaptischer Verbindungen vom PNN umgeben. Letzteres wird zum einen aus dem Neuron, welche diese umgeben, sowie von den umgebenen Gliazellen synthetisiert (Reichelt et al., 2019; Testa et al., 2019).

Funktionell ist das PNN insbesondere an der Stabilisierung von Synapsen, sowie an der Reduktion synaptischer Plastizität beteiligt (Härtig et al., 2022; Morphett et al., 2024;

Reichelt et al., 2019). Es kodiert gedächtnisrelevante Informationen und deren Aufrechterhaltung, indem die Kumulation konkurrierender Informationen während informationsbezogener Kodierungsprozesse inhibiert werden (Reichelt et al., 2019). Zudem fungiert das PNN durch ein anionisches Puffersystem, sowie einer Diffusionsbarriere als neuroprotektiver Schutz für die Neuronen (Christensen et al., 2021; Härtig et al., 2022; Reichelt et al., 2019). Die Detektion des PNNs kann mittels *Wisteria floribunda* Agglutinin (WFA) erfolgen, welches die N-Acetyl-Galactosamin (GalNAc)-Reste in Chondroitinsulfatketten erkennt, wodurch Bestandteile von Aggrecan detektiert werden können (Härtig et al., 2022). WFA fungiert somit als Marker, mittels welchem Bestandteile des PNNs im Gehirn visualisiert und immunhistologisch quantifiziert werden können. Veränderungen des PNN können zu neurologischen Erkrankungen führen.

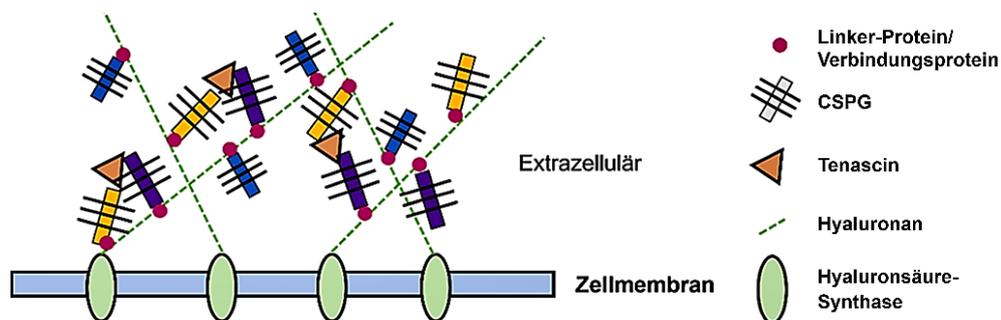


Abbildung 8: Schematische Darstellung der perineuronalen Netz (PNN) Struktur. Chondroitinsulfat-Proteoglykane (CSPGs) und deren Glykosaminoglykan-Ketten, Hyaluronan, Verbindungsproteine und Tenascin bilden zusammen das PNN als netzartige Struktur auf der Plasmamembran von Neuronen. Zu den CSPGs gehören die Proteoglykane Aggrecan, Neurocan, Brevican und Versican. (adaptiert nach Tewari et al., 2022).

1.5 Behandlungsmöglichkeiten

Die Behandlung von Patienten mit MCT8-Defekt erfolgt über kombinatorische Therapieansätze. Der Schwerpunkt derzeitiger Behandlungsmöglichkeiten liegt insbesondere in der symptomatischen Behandlung der Patienten, da bisher noch keine Heilungsmöglichkeiten für die Erkrankung bestehen. Die Einnahme von Schilddrüsenhormonen wie T3 ist hierbei kontraindiziert, da bereits eine periphere Thyreotoxikose besteht (van Geest et al., 2021; Verge et al., 2012).

Daher erfolgt zunächst eine fortlaufende konventionelle Basistherapie, welche die supportive Pflege von Patienten, Physiotherapie und die Gestaltung von Ernährungsplänen zur Vermeidung von Mangelerscheinungen umfasst. Die Basistherapie wird dann durch weitere therapeutische Ansätze ergänzt. Eine Behandlungsmöglichkeit bestand in der Vergangenheit in der Einnahme von Propylthiouracil (PTU) und Levothyroxine (LT4). PTU besitzt eine kurze Plasmahalbwertszeit und wird in der Leber metabolisiert. Zudem inhibiert PTU die Dejodinase-1 (DIO1), welche an der Umwandlung von T4 zu T3 beteiligt ist. Die anschließende Einnahme von LT4 verringert zuzüglich die endogene Produktion von T4 in Patienten (Wémeau et al., 2008). LT4 hat eine höhere Bioverfügbarkeit als PTU sowie eine längere Plasmahalbwertszeit. Die Multimedikation aus PTU und LT4 induziert jedoch keine Verbesserung psychomotorischer Fähigkeiten in Patienten, da die T3-Akkumulation nur sehr geringfügig reduziert wird. Zudem kann die Therapie hepatotoxisch wirken. Eine andere Therapieform besteht in der Wiederherstellung von Schilddrüsenhormonsignalen. Dies kann mittels 3,5,3',5'-Tetraiodthyroessigsäure (TETRAC), 3,5-Dijodthyreopropionsäure (DITPA), Sobetirome und 3,3',5-Trijodthyroessigsäure (TRIAC) erfolgen (Abb. 9). Hierbei fungiert insbesondere TRIAC als derzeit erfolgreichste Behandlungsform und ist ein Schilddrüsenhormon-Analogon, welches sowohl thyreomimetisch als auch MCT8-unabhängig ist und die endogene Produktion von Schilddrüsenhormonen geringfügig reduzieren kann (Horn et al., 2013). Darüber hinaus besteht ein weiteres noch zu untersuchendes Behandlungskonzept in der Einnahme von Natriumphanylbutyrat (NaPB), welches als chemisches Chaperon die Funktion fehl-gefalteter Proteine rekonstruieren kann (Grijota-Martínez et al., 2020; Horn et al., 2013).

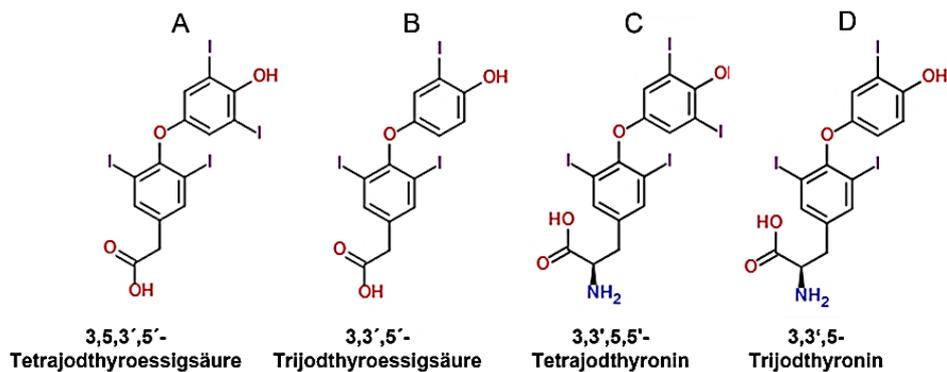


Abbildung 9: Schematische Darstellung der chemischen Struktur von 3,5,3',5'-Tetraiodthyroessigsäure (TETRAC), 3,3',5-Trijodthyroessigsäure (TRIAC), 3,3',5,5'-Tetraiodthyronin und 3,3',5-Trijodthyronin.

Tetraiodthyronin (T4) und 3,3',5-Trijodthyronin (T3). Strukturell besitzt TRIAC zwei Jodatome am inneren Benzolring mit zuzüglicher Säuregruppe als Seitenkette, sowie ein Jodatome an der 3' Position des äußeren Benzolrings. TETRAC besitzt eine hohe Strukturähnlichkeit zu TRIAC und besitzt ebenfalls eine 4-Hydroxyphenylgruppe mit zuzüglichem Vorhandensein eines weiteren Jodatoms am äußeren Benzolring. Die Jodsubstituenten befinden sich an 3, 3', 5 und 5' Position. Eigene Darstellung.

1.5.1 3,5,3'-Trijodthyroessigsäure

3,5,3'-Trijodthyroessigsäure (TRIAC) fungiert als Therapeutikum für Patienten mit MCT8-Defekt und findet bereits klinisch Anwendung. Aus der erfolgreichen Behandlung in klinischen Studien von Patienten mit TRIAC (TRIAC-Trial I and II: NCT02060474, NCT02396459) geht hervor, dass die Einnahme von TRIAC zu einer Verbesserung des allgemeinen Gesundheitszustandes führt, bei gleichzeitig bestehender Reduktion der peripheren Thyreotoxikose. Die Ergebnisse bestätigten vorangegangene Untersuchungen an Mäusen, welche ebenfalls unter Zugabe von TRIAC eine verringerte T3-Akkumulation im Körper zeigen, während die thyreomimetische Wirkung im Gehirn geringfügig verbessert wurde (Bárez-López et al., 2016; Grijota-Martínez et al., 2020). Hierbei unterstützt TRIAC die Wiederherstellung neuronaler Differenzierungs- und Myelinisierungsprozesse im Gehirn (Grijota-Martínez et al., 2020; Kersseboom et al., 2014).

TRIAC unterscheidet sich strukturell von T3 hinsichtlich der fehlenden Aminogruppe, sowie einer zusätzlichen Carboxylgruppe am Phenylring. Zudem ist TRIAC ein nukleärer T3-Rezeptor-Agonist, welcher bereits zur Behandlung von Patienten mit AHDS verwendet wird und in verschiedenen klinischen Studien getestet wurde (TRIAC-Trial I and II: NCT02060474, NCT02396459). Aufgrund dessen, dass MCT8 ubiquitär in Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten, als auch in der Blut-Hirn-Schranke exprimiert wird, führt folglich eine verminderte Funktionsfähigkeit des MCT8-Transportproteins zu einer reduzierten T3-Aufnahme im Gehirn. Im Vergleich zu T3 kann TRIAC über MCT8-unabhängige Transportmechanismen die Blut-Hirn-Schranke passieren und als T3-Analogon am nukleären T3-Rezeptor binden. Von letzterem gibt es verschiedene Isoformen (Horn et al., 2013). TRIAC besitzt eine gleich hohe Affinität zur Isoform TR α 1 des T3-Rezeptors wie T3, sowie eine höhere Affinität zu den Isoformen TR β 1 und TR β 2,

welche an negativen Rückkopplungsmechanismen der HPT-Achse beteiligt sind (Horn et al., 2013; Kersseboom et al., 2014). TRIAC besitzt ein höheres V_{max}/K_M -Verhältnis, als T3 zum T3-Rezeptor (Horn et al., 2013).

Zudem besitzt TRIAC als T3-Analogon eine ähnliche Wirkung wie T3, wodurch dessen Bindung am T3-Rezeptor ebenfalls die Expression T3-abhängiger Gene reguliert, jedoch bestehen unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften. TRIAC hat eine kürzere Halbwertszeit, wodurch die metabolische Potenz im Vergleich zu T3 geringer ist. Aufgrund dessen ist eine mehrfache Einnahme einer höheren TRIAC Dosis über den Tag hinweg notwendig, um vergleichbare Effekte wie T3 zu erzielen. TRIAC wird zudem schneller metabolisiert als T3. Die Regulation T3-abhängiger Gene in verschiedenen Geweben erfolgt zudem durch spezifische Promotoren, welche in den entsprechenden Geweben exprimiert werden, weshalb die Wirkung von TRIAC und T3 in verschiedenen Geweben unterschiedlich sein kann (Horn et al., 2013; Kersseboom et al., 2014). T3 und TRIAC verwenden unterschiedliche Promotoren, woraus sich eine unterschiedliche Genregulation unterschiedlicher Gene ergibt. Dieselben Gene können somit unterschiedlich reguliert werden. Überdies führt die Bindung von TRIAC am T3-Rezeptor zu einer negativen Rückkopplung innerhalb der HPT-Achse, sowie der TSH-Sekretion, wodurch es zu einer geringfügigen Repression der endogenen Biosynthese und Freisetzung von T3 aus der Schilddrüse kommen kann (Horn et al., 2013; Kersseboom et al., 2014). Folglich akkumuliert weniger T3 im Körper. Im Vergleich zu T3 besitzt TRIAC eine kürzere Plasmahalbwertszeit. TRIAC besitzt eine hohe Affinität zum T3-Rezeptor und wird ähnlich wie T3 metabolisiert und dejodiert (Kersseboom et al., 2014). Die kürzere Halbwertszeit von TRIAC reduziert das Risiko einer Überdosierung, woraus sich weniger Risiken für kumulative-Effekte ergeben, jedoch ist eine vermehrte Einnahme des Medikaments notwendig. Die Wirkstoffpegel und Plasmakonzentrationen sind demnach instabil. Die TRIAC Synthese kann über eine Desaminierung und Decarboxylierung erfolgen, bei welcher die Oxidation des T3 Amins zur Bildung von TRIAC führt, während TRIAC und T3 während der Metabolisierung durch Dejodierung und Konjugation von Sulfat wasserlöslich werden (Groeneweg et al., 2017; Köhrle, 2019). Die Dejodierung von TRIAC mit Dio1 und Dio3 führt zur Bildung von 3,3'-Dijodessigsäure. Eine weitere Dejodierung induziert die Metabolisierung zu Thyreoessigsäure, welche dann ausgeschieden werden kann (Groeneweg et al., 2017; Köhrle, 2019; Rutgers et al., 1989).

1.5.2 3,3',5,5'-Tetraiodthyroessigsäure

3,5,3',5'-Tetraiodthyroessigsäure (TETRAC) gilt ebenfalls als potenzielles Therapeutikum, jedoch im Vergleich zu TRIAC ohne klinische Anwendung auf Patienten mit MCT8-Defekt. TETRAC ist das desaminierte-Analogon von L-Thyroxin (T₄) und wie TRIAC ebenfalls ein natürlich vorkommender TH-Metabolit mit einer Halbwertszeit von 3-4 Tagen. Vorangegangene Untersuchungen an COS1-Zellen zeigten, dass TETRAC einen vom MCT8- und OATP1C1-Transportprotein unabhängigen Transportmechanismus verwendet (Horn et al., 2013). In einer vorangegangenen Studie wurde die Wirkung von TETRAC an Mäusen getestet. Diese erhielten in den ersten postnatalen Wochen TETRAC in einer täglichen Dosis von 400 ng/g Körpergewicht (Horn et al., 2013). Hierbei wirkte TETRAC positiv auf die Schilddrüsenhormon-abhängige neuronale Differenzierung im Kortex, Cerebellum und Striatum. Zudem wurde die Dendritogenese von Purkinje-Zellen im Kleinhirn unterstützt. Weiterhin kann anhand von Mausmodellen gezeigt werden, dass TETRAC die T₃-abhängige Genexpression als pharmakologisch wirksamer T₃R-Agonisten induziert (Horn et al., 2013). Aufgrund der supportiven Wirkung auf die neuronale Differenzierung im Gehirn könnte TETRAC als Therapeutikum für Patienten mit MCT8-Defekt in Betracht gezogen werden. Zudem induziert die Einnahme von TETRAC eine Reduktion von TSH in Patienten. Die hypothalamische TRH-Expression wird jedoch nicht reprimiert (Horn et al., 2013). Als TH-Metabolit wird TETRAC insbesondere in der Leber durch eine Decarboxylierung und oxidative Desaminierung der Alanin-Seitenkette generiert (Horn et al., 2013).

1.5. 3 3,5-Dijodthyropropionsäure und Sobetirome

TRIAC wird derzeit zur Behandlung von Patienten mit MCT8-Defekt angewendet. Daneben bestehen weitere Medikamente, welche potenziell zur Behandlung verwendet werden können. In einer Studie wurde 3,5-Dijodthyreopropionsäure (DITPA) zur Behandlung von Patienten mit MCT8-Defekt hinzugezogen. Hierzu bestehen Fallstudien, bei welchen Kinder unter medizinischer Aufsicht mit 2,0 und 2,4 mg/kg DITPA therapiert wurden (Verge et al., 2012). Diese zeigen einen Rückgang der Herzfrequenz, während der Cholesterinspiegel ansteigt (Verge et al., 2012). Die Verfügbarkeit von DITPA

korrelierte mit reduzierten T3-Werten in der Peripherie, wodurch sich die Symptomatik einer Thyreotoxikose verringerte (Verge et al., 2012). Entsprechend des Bayley-III-Scores war keine Verbesserung der psychomotorischen Fähigkeiten zu verzeichnen. Die Behandlung mit DITPA zeigt eine limitierte und geringfügige Verbesserung des Gesundheitszustands der Patienten (Verge et al., 2012).

Im Weiteren wurde Sobetrome zur Untersuchung des MCT8-Defekts hinzugezogen. Hierzu wurden *Mct8/Dio2*^{-/-}-defiziente (*Mct8*^{-/-};*Oatp1c1*^{-/-}) Mäuse mit täglich 1 mg Sobetrome/kg, 0,3 mg Sobetrome/kg oder Kochsalzlösung behandelt (Bárez-López et al., 2018). Die Behandlung mit Sobetrome führte zu einer Reduktion der T4 und T3-Plasmawerte, während zuzüglich die Expression von T3-abhängigen Genen, zu welchen *Hr*, *Abcd2* und *Flywch2* gehören, stimuliert werden (Bárez-López et al., 2018). Insgesamt ist sowohl eine neurologische als auch periphere Reduktion der Symptomatik eines MCT8-Defekts limitiert möglich (Bárez-López et al., 2018).

1.6 Ziele der Arbeit

1.6.1 Charakterisierung und Identifizierung des 3,5,3'-Trijodthyroessigsäure (TRIAC) - Transporters

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit besteht in der Generierung von Überexpressionsklonen, welche die Kandidatengene potenzieller TRIAC-Transporter überexprimieren. Diese sollen im Weiteren mittels Immunfluoreszenzfärbung quantifiziert werden und der Identifizierung und Validierung von TRIAC-Transportproteinen mit nachfolgender Assay Optimierung dienen. Des Weiteren sollen zusätzliche Substrate getestet werden, um zu untersuchen, ob diese ebenfalls die gleichen Transportproteine verwenden können, um in die Zelle zu gelangen. Hierbei werden die Substrate ¹²⁵I-rT3, ¹²⁵I-T3, ¹²⁵I-T4, ¹²⁵I-TETRAC, DITPA und Sobetrome inkludiert. Ziel ist es, die ¹²⁵I-TRIAC-Transportproteine zu identifizieren und zu charakterisieren, sowie weitere Jodthyronine, Analoga oder Derivate zu identifizieren, welche über die jeweiligen Transportproteine transportiert werden können.

Transportproteine sind essenziell für die Verteilung, Absorption, Elimination und Wirkung von Medikamenten im Körper. Die Identifizierung der TRIAC-Transportproteine, sowie

weiterer transportierbarer Substrate kann dabei helfen, Medikamenteninteraktionen aufzudecken und unerwünschte Arzneimittelwirkungen zu reduzieren. Zudem könnten hierdurch personalisierte Behandlungsansätze entwickelt, als auch derzeitige therapeutische Möglichkeiten im Kontext der Arzneimittelwirkung optimiert werden.

1.6.2 Charakterisierung von Mct8-Mausmodellen mit Missensmutation

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit besteht in der histologischen Charakterisierung von Mct8^{L223R/y}, Mct8^{L366W/y}, Mct8^{P253L/y} und Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-} Mäusen hinsichtlich der Zellzahl und Fluoreszenzintensität Parvalbumin (PV)-, Calretinin (CR)-, neuronaler Nukleus (NeuN)- und Calbindin (CB) -positiver Zellen im Barrel-Feld des primären-somatosensorischen-Kortex 1 (S1BF), sowie die Myelinintensität im Cingulum des Corpus Callosum. Überdies soll *Wisteria floribunda* Agglutinin (WFA) als neuer und weiterer Untersuchungsparameter des perineuronalen Netzes (PNN) in Mausmodellen mit Mct8-Defekt eingeführt werden. Ziel soll die histologische Untersuchung der Mct8-Mausmutanten Mct8^{L366W/y}, Mct8^{P253L/y} und Mct8^{L223R/y} sein. Im Weiteren wird untersucht, ob diese einen neurologischen Phänotyp haben könnten. Zudem soll eine Untersuchung dahingehend erfolgen, ob Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-} Mäuse als besseres Mausmodell fungieren könnten. Mittels Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-} Mäusen erfolgt eine Untersuchung dahingehend, ob ein Mct8-Defekt zu einer Reduktion des PNNs, welches mittels des neu eingeführten Markers *Wisteria floribunda* Agglutinin (WFA) detektiert werden kann, führen könnte. Überdies besteht ein weiteres Ziel in der Genexpressionsanalyse von *Mct8*, *Dio1*, *Dio2* und *Aldh1a1* in verschiedenen Organen von Mct8^{L223R/y} Mausmutanten, zu welchen das Herz, Leber, Niere, Gehirn, Hippocampus und Cerebellum gehören.

Die hierbei generierten Ergebnisse können dem grundlegenden Verständnis der den Mutationen zugrundeliegenden biologischen Mechanismen dienlich sein. Zukünftig können weitere Grundlagenforschungen an den hier genannten Mausmodellen erfolgen und für die translationale Medizin verwendet werden. Zudem könnten die hier generierten Ergebnisse auf die korrespondierenden Punktmutationen im MCT8-Transportprotein von Patienten angewendet werden, wodurch individuelle therapeutische Ansätze entwickelt werden können. Hierbei könnten weitere Validierungen hinsichtlich des perineuronalen Netzes zu einem besseren Verständnis der Erkrankung in Patienten beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterial und Reagenziensysteme

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien, Hersteller und Land.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller, Land
Nitril Handschuhe S	MiCo-Touch, Australien
Eppendorf Tubes (1,5 µl; 2 µl)	Eppendorf, Deutschland
Röntgenfilm	Fuji Film Medical X-Ray Film, Japan
Pipetten	Eppendorf Research plus, Deutschland
Parafilm	Bemis, USA
Erlenmeyerkolben, Messzylinder, Bechergläser	Schott Duran, Deutschland
SuperFrost-Objektträger	Superfrost™ Plus Microscope Slides, USA
Objektträger	Menzel Glaser, Deutschland
Deckgläser 18x18 mm	Paul Marienfeld GmbH, Deutschland
Pipettenspitzen	Ratiolab Deutschland, Eppendorf, Deutschland
Kulturschalen (6 cm; 10 cm)	Sarstedt, Deutschland
Kulturflaschen (T25; T75)	Sarstedt, Deutschland
Parafilm	Laboratory Supplier, USA
Vernichtungsbeutel 2 l	Sarstedt, Deutschland
Spritzenfilter 10 µm	MoBiTec GmbH, Deutschland
Kanüle 0,3 mm	BD Microlance, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Sarstedt, Deutschland
Multi-well-Platten mit Flachboden (6er; 24er)	Sarstedt, Deutschland
Mikrotiterplatten mit Flachboden (96er)	Sarstedt, Deutschland
UV-Küvetten 2 ml	Sarstedt AG und Co KG, Deutschland
Serologische-Pipetten 10 ml	Costar Stripette, USA, Sarstedt, Deutschland

Tabelle 2: Reagenziensysteme, Hersteller und Land.

Reagenziensysteme	Hersteller, Land
pCMV6-entry Vector System	Promega, USA
Takyon Low Rox Syber MasterMix dTTP Blue	Takyon, Belgien

iScript cDNA-Synthese
2.1.2 Geräte, Software und Datenbank

BioRad, USA

Tabelle 3: Geräte, Hersteller und Land.

Geräte	Hersteller, Land
Spektralphotometer	Thermo Electron cooperation, USA
PerfctBlue Mini-L Elektrophorese-Kammer	Peqlab Biotechnology Lab, Deutschland
VWR shiroGel Vertikale PAGE-System	Peqlab Biotechnology Lab, Deutschland
Elektrophoresis-Power Supply PS 300V	Consort, Belgien
VWR kuroGel, Semi-Dry-Blotter	Peqlab VWR Company, Deutschland
Laborwaage / Präzisionswaage	Satorius, Deutschland
Labor pH-Meter	VWR, USA
UV-Lichtquelle	Knick, Deutschland
UV-Kammer	Pharmacia, Schweden
Thermocycler	Intas, Deutschland
Mastercycler Realplex ²	Eppendorf, Deutschland
Eppendorf tube thermos-shaker	Eppendorf, Deutschland
Incubator-Shaker series	HLC, Deutschland
Inkubator-Shaker	Innova ⁴⁰ , USA
Pellet-pestles	New Brunswick Scientific GmbH, USA
WB-Entwicklermaschine für X-Ray-Filme	Kimble, USA
Magnetic stirrer AREX-6 Connect-Pro	CAWO CAWOMat, Deutschland
Zentrifuge 5430 R	Velp Sceintific, Italien
Mini-Zentrifuge	Eppendorf, Deutschland
Kryostat CM3050 S	Labnet, USA
Fluoreszenzmikroskop	Leica, Deutschland
Labofuge 400R	Leica, Deutschland
Abzug-Zellkultur	Thermo Scientific, USA
Keyence BZ-X810-Fluoreszenzmikroskop	Heraeus Instruments, Deutschland
Lichtmikroskop	Keyence, Deutschland
Binder Standard-Inkubator	Zeiss, Deutschland
Thermoblock	Binder, Deutschland
Wasserbad klein/groß	Eppendorf, Deutschland
Vortexer-VF-2	Julabo, Deutschland
Heizplatte	Janke und Kunkel Labortechnik, Deutschland
Axiocam 705 Mikroskop	Scientifica, England
Contamination Monitor (Isotopie)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Roto-Shake-Gene (Isotopie)	Berthold Technologies, Deutschland
Inkubator (Isotopie)	Scientific Industries, USA
	New Brunswick Galaxy 145, USA

Liquid Scintillation Analyzer (Isotopie)	Perkin Elmer, USA
Multi Crystal Gamma Counter (Isotopie)	Berthold Technologies, Deutschland
TC-Dos Dosimeterkassette mit Ring (Isotopie)	MPA, NRW, Deutschland

Tabelle 4: Geräte, Hersteller und Land.

Software	Hersteller, Land
GrapPad Prism Ver. 10.1.0 (264)	GraphPadSoftware, LLC, USA
Microsoft Office 2019	Microsoft Corporation, USA
ApE a plasmid editor (v3.1.6)	Entwickelt von Dr. Wayne Davis, USA
Snapgene (7.2)	Insightful Science, USA
ImageJ (Java 1.8.0_322 64-bit)	National Institutes of Health, NIH, von Wayne Rasband, USA
BZ-X800 Analyzer (X-800)	Keyence Corporation, Deutschland
Zeiss (3.9)	Carl Zeiss AG, Deutschland

Tabelle 5: Datenbank and Hyperlinks.

Datenbank	Hyperlink
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Blast	https://www.Blast.ncbi.nlm.nih.gov/

Tabelle 6: Chemikalien, Lösungen, Hersteller und Land.

Chemikalien, Lösungen	Hersteller, Land
Chloroform	PanReac AppliChem, Spanien
Panflect Transfektionslösung	PanBiotech, Deutschland
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	ThermoScientific, USA
TEMED	PanReac AppliChem, Spanien
Sephadex LH20	Pharmacia, Schweden
Trizol	Invitrogen, USA
Bradford	Bio-Rad, USA
Rotiphorese NF-Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	CarlRoth, Deutschland
TEMED	Invitrogen, USA
Paraformaldehyd	CarlRoth, Deutschland
Formaldehyd	Merck, Deutschland
Isopropanol	TH Geyer, Deutschland

Ethanol 70 %; 100 %	PanReac AppliChem, Spanien
BSA	PanReac AppliChem, Spanien
PFA 4 %	CarlRoth, Deutschland
Tween™ 20	PanReac AppliChem, Spanien
TRITON X-100	PanReac AppliChem, Spanien
Agarose, universal	LifeScience, Deutschland
Nonfat-Dried Milk bovine	Sigma Aldrich, USA
D(+) Succrose	PanReac AppliChem, Spanien
Tris ultrapure	PanReac AppliChem, Spanien
Natriumhydrogenphosphat Monohydrat	PanReACAppliChem, Spanien
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	CarlRoth, Deutschland
PanfectBuffer	PanBiotech, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 siRNA-Screening potenzieller TRIAC-Kandidatengene

Die Identifizierung potenzieller TRIAC-Kandidatengene erfolgt durch Prof. Dr. Krause und Dr. Protze (Abteilung für Strukturbiologie, Leibniz-Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie (FMP), Berlin, Deutschland). Diese haben die Kandidatengene *SLC29A2/ENT2*, *SLC22A9/OAT7* und *ABCD1/ALDP*, als potenzielle TRIAC-Kandidatengene identifiziert. Die hier genannten Kandidatengene werden per Gensynthese hergestellt und in einen pCMV6-entry Expressionsvektor (Rockville, USA) kloniert, sowie von der Arbeitsgruppe unter der Bestellnummer *SLC22A9* (NM_080866; RC211997), *SLC29A2* (NM_001532; RC210776) und *ABCD1* (NM_000033.; RC206885) eingekauft, sowie in der hier vorliegenden Arbeit experimentell weiter untersucht und validiert (Abb. 10).

Hierbei werden die in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten Sequenzen in Großbuchstaben und in 5' nach 3' Richtung entsprechend der üblichen Terminologie angegeben. Es wird keine Unterscheidung zwischen Plasmiden und Sequenzen von Mäusen und Menschen gemacht. Proteinennamen als auch Plasmide werden nicht in Kursivschrift geschrieben. Gennamen hingegen werden kursiv dargestellt.

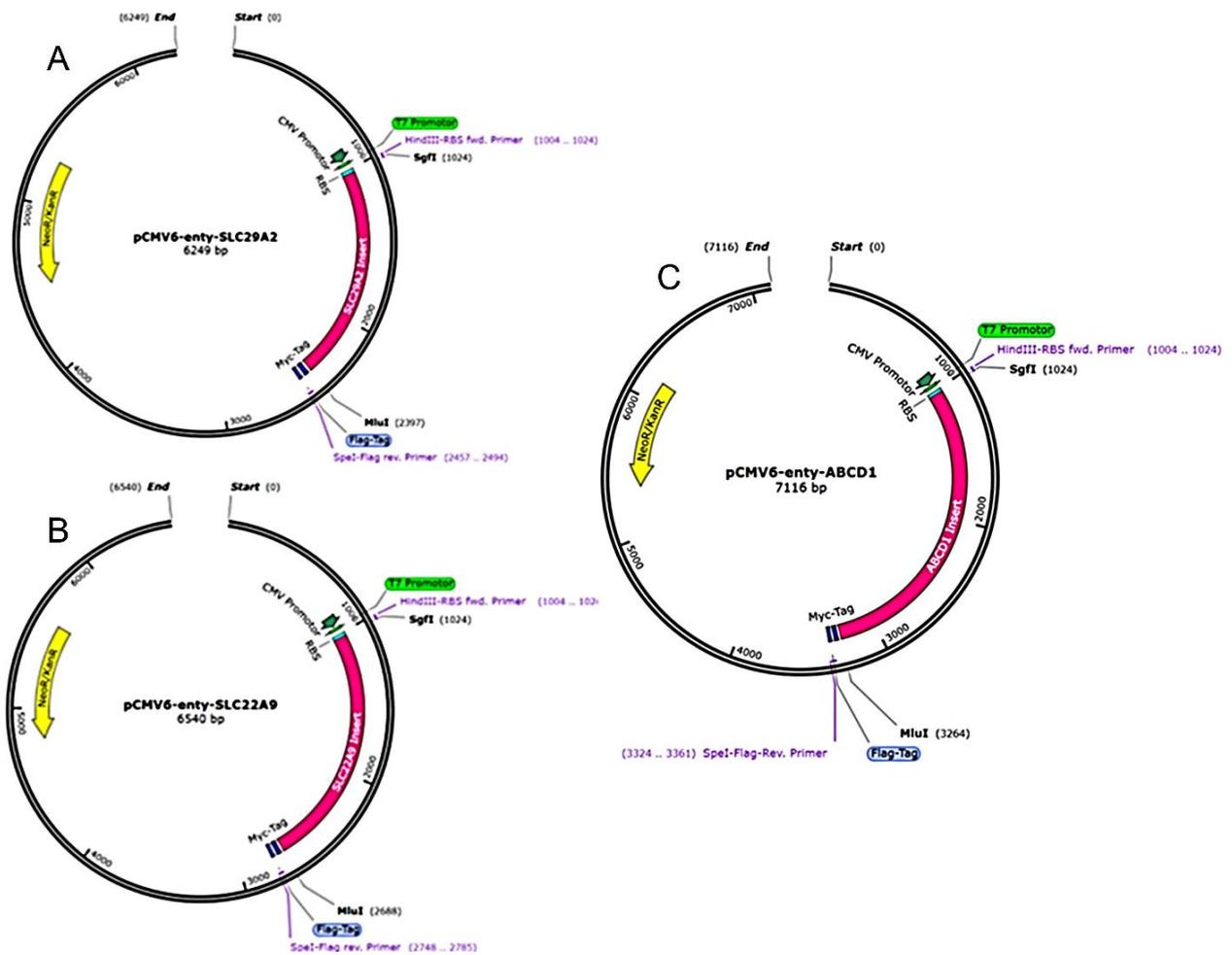


Abbildung 10: *SLC29A2*_pCMV6-entry (A), *SLC22A9*_pCMV6-entry (B) und *ABCD1*_pCMV6-entry Vektor (C). *SLC29A2*_pCMV6-entry hat 6249 bp (A), während *SLC22A9*_pCMV6-entry 6540 bp besitzt (B). *ABCD1*_pCMV6-entry hat 7116 bp (C). Jedes der eingekauften Plasmide besitzt einen Flag-Tag und einen Myc-Tag (blau), wodurch die Detektion der Kandidatengene (pink) ermöglicht wird. Zudem geht aus der Abbildung eine NeoR/KanR Resistenz (gelb) hervor (A, B, C). Alle Plasmide besitzen einen T7-Promotor (grün), sowie CMV-Promotor (A, B, C). Eigene Darstellung.

2.2.2 Transformation der Kandidatengene in XL1-Blue Bakterien

Mittels einer Transformation kann Fremd-DNA in Bakterien eingebracht werden. Für die Transformation werden die Plasmide *SLC29A2*_pCMV6-entry, *SLC22A9*_pCMV6-entry und *ABCD1*_pCMV6-entry in XL1-Blue Bakterienstämme (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]*) eingebracht (Tab. 7; Tab.

8). Hierzu werden 2 µl Plasmid (500 ng/µl) in 45 µl XL1-Blue Bakterien ($1,54 \cdot 10^7$ µg) hinzu pipettiert und anschließend für 20 min auf Eis gelagert. Nachfolgend wird ein Hitzeschock für 45 sek bei 42 °C vorgenommen und danach 3 min auf Eis gelagert. Anschließend werden 500 µl LB-Medium (ohne Antibiotika) hinzugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 °C und 300 rpm im Thermomixer (Eppendorf, Deutschland) inkubiert. Davon werden 75 µl entnommen und auf einer LB-Agar-Platte ausplattiert. Der LB-Agar-Platte wird zuvor das Antibiotikum Kanamycin in einer Endkonzentration von 25 µg/ml hinzugegeben. Abschließend werden die LB-Agar-Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag werden die Klone gepickt und zusammen mit LB-Medium in einen Erlenmeyerkolben transferiert. Das LB-Medium wird zudem mit Kanamycin (25 µg/ml) versetzt. Es erfolgt eine über Nacht Inkubation bei 37 °C und 160 rpm im Schüttler (Innova40, USA).

Tabelle 7: Verwendete Plasmide, Gennamen und Open reading frame. Der pCMV6-entry Vektor umfasst 4919 bp.

Plasmid	Ursprung und Genname	Open reading frame [bp]
<i>SLC29A2_pCMV6-entry</i>	<i>SLC29A2</i> - NM_001532.3 – human	1368
<i>SLC22A9_pCMV6-entry</i>	<i>SLC22A9</i> - NM_080866.3 – human	1659
<i>ABCD1_pCMV6-entry</i>	<i>ABCD1</i> - NM_000033.4 – human	2235

Tabelle 8: Verwendete Lösung.

Lösung	Volumen [l], Masse [g]	Chemikalien
LB-Medium	25 auf 1 l H ₂ O auffüllen	LB-Broth (Miller), Sigma-Aldrich
LB-Agar	32 auf 1 l H ₂ O auffüllen	LB, Invitrogen

2.2.3 DNA-Midi-Präparation

Mittels einer DNA-Aufreinigung ist es möglich, Plasmide aus Bakterien zu extrahieren. Zur Aufreinigung der Plasmide wird das NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel, Deutschland) verwendet. Das aufgereinigte Plasmid wird in 100 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

2.2.4 Restriktionsanalyse

Mittels einem Restriktionsverdau kann DNA an spezifischen Restriktionsschnittstellen geschnitten werden. Ein Verdau mit Restriktionsenzymen fungiert als Kontrolle, mittels welchem die Überprüfung der Integration der Insertsequenz in einen Vektor erfolgen kann. Hierbei wird der pCMV6-entry Expressionsvektor verwendet, welcher der Proteinexpression spezifischer Zielsequenzen dienlich ist. Die Negativkontrolle enthält keine Enzyme, sodass der Ansatz unverdaut bleibt (Tab. 9; Tab. 10). Danach werden alle Ansätze für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend auf ein 1,5 % (w/v) Agarosegel aufgetragen. Die horizontale Gelelektrophorese wird für 1 h und bei einer elektrischen Spannung von 125 V und 300 mA (Consort, Belgien) eingestellt. Als Marker fungiert der GeneRuler™ 1 kb Plus DNA, während der 6x DNA Loading dye (ThermoScientific, USA) den PCR-Proben vor Auftragung auf das Gel zugegeben wird. Der Ethidium-Bromid (EtBr) Ersatz HD-Green Plus DNA Stain (Intas, Deutschland) dient der Detektion der Banden unter dem UV-Licht.

Tabelle 9: Verwendet Ansätze.

Restriktionsanalyse	Unverdaute Negativkontrolle
500 ng DNA	500 ng DNA
2 µl 10xTango Buffer	
0,2 µl ASIS I (10 u/µl)	
0,8 µl Mlu I (10 u/µl)	
mit RNase-freiem Wasser auffüllen	mit RNase-freiem Wasser auffüllen
Σ 20 µl	Σ 20 µl

Tabelle 10: Verwendete Lösung.

Lösung	Volumen [μ l,ml], Masse [g]	Chemikalien
Agarose Gel	1 g 3 μ l auf 0,1 l ml H ₂ O auffüllen	Universal Agarose HD-Green Plus

2.2.5 Sequenzierung

Mittels einer Sequenzierung ist es möglich, die Plasmid-Integrität zu überprüfen. Hierzu wird die DNA am Life und Medical Sciences-Institut (LIMES) in Bonn sequenziert. In diesem Kontext wird das Protokoll von LightRun gatac-biotech verwendet und die Proben mit einem Barcode versehen. Es werden 5 μ l einer 5 μ M (5 pmol/ μ l) Primerlösung, sowie 5 μ l DNA (80 - 100 ng/ μ l) zusammen pipettiert (Tab. 11).

Tabelle 11: Verwendete Plasmide, Primer und Sequenzen.

Plasmide	Primer	Sequenzen
<i>SLC29A2_</i> NM_001532.3	XL39_rev	5' ATTAGGACAAGGCTGGTGGG 3'
	CMV_fwd	5' CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG 3'
	<i>SLC29A2_800bp_rev</i>	5' CGGCTCCTTCTCCAGGTCAAGATC 3'
<i>SLC22A9_</i> NM_080866.3	XL39_rev	5' ATTAGGACAAGGCTGGTGGG 3'
	CMV_fwd	5' CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG 3'
	<i>SLC22A9_1000bp_rev</i>	5' CATATGTTGGGCATGTGGAGC 3'
<i>ABCD1_</i> NM_000033.4	XL39_rev	5' ATTAGGACAAGGCTGGTGGG 3'
	CMV_fwd	5' CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG 3'
	<i>ABCD1_1000 bp_rev</i>	5' CTGCTCCAGCATAACATACC 3'

2.2.6 Zellkulturmethoden und Bedingungen

Zellbiologische Experimente erfolgen unter sterilen, sowie standardisierten Bedingungen. Der hierbei verwendete Inkubator (Binder, Deutschland) hat eine 95 % Luftfeuchtigkeit, 37 °C und 5 % CO₂-Zufuhr. Als Nährmedium fungiert das Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium F12 (DMEM/F12 1:1) (PanTMBiotech, Deutschland), welches mit 10 % (v/v) fötalem Rinderserum (FBS) (PanBiotech, USA), sowie 1 % (10.000 U/ml) Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) (Gibco, USA) versetzt wird (Tab. 12). Zur Selektion der Zellen wird ein Selektionsmedium verwendet. Dieses enthält 0,5 % von dem Aminoglycosid-Antibiotikum G418 (50 mg/ ml) (ThermoScientific, USA). Die Verwendung von G418 erfolgt aufgrund des im pCMV6-entry-Vektorsystem enthaltenen Neomycin Phosphotransferase II (nptII) Gen, welches mit einer Resistenz gegen die Antibiotika Neomycin, Kanamycin und G418 einhergeht. In einem 48 h Intervall erfolgt ein regelmäßiger Mediumwechsel, während die Zellen bei einer Konfluenz von 80 - 90 % passagiert werden.

Tabelle 12: Verwendetes Nährmedium und Selektionsmedium.

Art des Mediums	Zelltyp	Medium	Serum	Antibiotika
Nährmedium	MDCK1	DMEM/F12 1:1	10 % FCS	1 % Pen/Strep
Selektionsmedium	MDCK1	DMEM/F12 1:1	10 % FCS	0,5 % G418

2.2.7 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für eine Langzeitlagerung und Konservierung von Zellen werden diese bei sehr niedrigen Temperaturen aufbewahrt. Die Lagerung der Zellen erfolgt bei -80 °C, sowie zur längeren Aufbewahrung bei -140 °C.

Das Auftauen der Aliquots erfolgt bei Raumtemperatur mit nachfolgendem Transfer in ein Zentrifugenröhrchen, sowie Zugabe von 5 ml Nährmedium (Gibco, UK). Danach werden die Zentrifugenröhrchen für 5 min bei Raumtemperatur, sowie 1200 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird erneut in Nährmedium resuspendiert und auf T25-Kulturflaschen verteilt. Abschließend werden die Zellen bei 37 °C inkubiert. Das

Einfrieren der Zellen erfolgt bei 80 – 90 % Konfluenz. Diese werden dann mit PBS gewaschen und anschließend mit 2,5 % (10x) Trypsin trypsiniert (Gibco, USA). Hierzu werden die Zellen für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird mit Nährmedium abgestoppt und danach alles in ein Zentrifugenröhrchen transferiert. Es erfolgt eine Zentrifugation für 5 min bei Raumtemperatur und 1200 x g (ThermoScientific, USA). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, sowie abschließend in ein Kryoröhrchen transferiert (Tab.13).

Tabelle 13: Verwendetes Einfriermedium.

Lösung	Prozentualer Anteil [%]	Chemikalien
Einfriermedium	10 %	DMSO
	10 %	FCS
	1 %	Pen/Strep
		Medium DMEM F12 1:1

2.2.8 Stabile Transfektion von MDCK1-Zellen

Mittels einer stabilen Transfektion können stabile Zelllinien mit Langzeitexpression von spezifischen Insertsequenzen generiert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten MDCK1-Zellen sind innerhalb der Arbeitsgruppe gut etabliert und haben sich aufgrund eines geringen Hintergrundes bei der Durchführung von ¹²⁵I-T3-Aufnahme-Assay als zuverlässiges Modell dargestellt.

Zunächst werden zwei Ansätze generiert. Ansatz A enthält 7,5 µl Panfect A (PanBiotech, Deutschland), sowie 192,5 µl Panfect-Puffer (PanBiotech, Deutschland). Ansatz B enthält 1,5 µg DNA und wird mit Panfect-Puffer auf ein Endvolumen von 200 µl gebracht. Danach werden beide Ansätze gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der neue Ansatz vorsichtig auf eine 6 cm Schale mit MDCK1-Zellen pipettiert. Abschließend werden die MDCK1-Zellen für 48 h im Nährmedium inkubiert.

2.2.9 Selektion stabil transfizierter MDCK1-Zellen mit Selektionsmedium

Eine Selektion von Zellen mit Selektionsmedium kann das Überleben von den Zellen gewährleisten, welche nach Transfektion die jeweiligen Plasmide mit dem entsprechenden Resistenzgen aufgenommen haben. Anschließend erfolgt in einem Intervall von 48 h ein Mediumwechsel. Letzteres erfolgt fortlaufend, bis weiße und voneinander isoliert sichtbare Kolonien in der Kulturschale erkennbar sind.

2.2.10 Isolierung von Zellklonen

Mit 200 µl Selektionsmedium können Zellklone von der Kulturschale isoliert werden. Die Klone können hierbei einzeln in ein well einer 24er-multi-well-Platte überführt und bei 37 °C inkubiert werden. Bei 90 % Konfluenz werden die Zellen für 5 min bei 37 °C und 200 µl der Serinprotease Trypsin inkubiert. Die Zellen lösen sich hierdurch von der Kulturschale. Die Trypsinierung wird mit 5 ml Selektionsmedium gestoppt und nachfolgend die Zellen in eine T25-Flasche transferiert, sowie anschließend bei 37 °C inkubiert.

2.2.11 Ernten von Zellen

Für weitere Analysen und Experimente können Zellen von der Kulturschale mit einem Zellschaber geerntet. Geerntete Zellen werden in ein Eppendorf-Tube transferiert, welches für 10 min bei 4 °C, sowie 1000 x g zentrifugiert wird. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 1 ml HD-Puffer resuspendiert (Tab. 14).

Tabelle 14: Verwendete Puffer. Folgende Abkürzungen werden verwendet: HEPES; 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, EDTA; Ethylendiamintetraacetat, HD; Homogenisierungspuffer, DTT; Dithiothreitol.

Puffer	Molarität [M], Volumen [µl], Prozentualer Anteil [%]	Chemikalien
HD-Puffer	1000 µl	Homogenisierungspuffer pH 7,4

	1 µl (1:1000)	1 M DTT
Homogenierungspuffer	0,25 M 0,02 M 0,001 M	Sucrose HEPES EDTA Auf 0,1 l destilliertem Wasser auffüllen und auf pH 7,4 einstellen
10x PBS	1,37 M 0,027 M 0,125 M 0,018 M	NaCL KCL Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O KH ₂ PO ₄ Auf 1 l destilliertem Wasser auffüllen und auf pH 7,4 einstellen

2.2.12 Bradford-Assay

Mit einem kolorimetrischen Bradford-Assay (Tab. 15; Tab. 16) kann die Proteinkonzentration bestimmt werden. In Küvetten (Thermon Electron cooperation, USA) werden 1000 µl einer Bradford-Lösung vorgelegt und jeweils 2 µl der geernteten Zellen hinzugegeben. Hierbei fungiert der BSA-Standard (1,52 mg/ml) als Referenz zur Quantifizierung der Proben (Tab. 15). Diese werden nachfolgend für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in einem Spektralphotometer (Thermo Electron cooperation, USA) vermessen.

Tabelle 15: Aufsteigende Konzentrationsreihe mittels Bradford-Lösung.

Aufsteigende Konzentrationsreihe	Bradford [µl]	BSA-Standard [µl]
Kontrolle	1000 µl	0 µl
1:500	998 µl	2 µl
1:200	995 µl	5 µl
1:100	990 µl	10 µl
1:65	985 µl	15 µl
1:39	975 µl	25 µl

Tabelle 16: Verwendete Lösung und Standard.

Puffer	Volumen [ml], Prozentualer Anteil [%]	Chemikalien
Bradfordlösung	4 ml 16 ml	Bradford destilliertes Wasser
Standard 1,52 mg/ml	1 ml 0,2 ml (1:2)	Homogenisierungspuffer pH 7,4 destilliertes Wasser

2.2.13 Western-Blot mit stabil transfizierten MDCK1-Zellen

Ein Western-Blot ist eine Labormethode, mittels welcher der Nachweis von Proteinen auf einer Membran möglich ist. Zur Durchführung eines Western-Blots (WB) wird ein 5 % (v/v) Sammelgel sowie ein 10 % (v/v) Trenngel vorbereitet (Tab. 17; Tab. 18; Tab. 19). Vor dem Auftragen der Proben auf das Polyacrylamidgel werden diese für 10 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend werden die Geltaschen mit 80 µg Protein und einem Größenstandard beladen (Tab. 17; Tab. 18; Tab. 19). Bei dem Größenstandard handelte es sich um den PageRuler Prestained Protein Ladder (10 – 180 kDa) (Thermo Scientific, USA).

Untransifizierte MDCK1-Zellen fungieren hierbei als Negativkontrolle. Danach wird die Gelelektrophoresekammer (VWR, USA) an eine Stromquelle (Consort, Belgien) bei 65 V und 300 mA angeschlossen, wodurch die Proteine entsprechend dem Molekulargewicht aufgetrennt werden können. Nachfolgend wird ein halbtrockenes-Blotting durchgeführt. Hierbei erfolgt ein horizontaler Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm) (Amersham™ Protran™, Deutschland). Der Transfer erfolgt für 50 min bei einer elektrischen Spannung von 25 V und 300 mA. Die Anfärbung der Membran mit Ponceau S dient dabei der Überprüfung des erfolgreichen Proteintransfers. Anschließend wird die Membran für 60 min in 5 % (w/v) Magermilch inkubiert, sowie nachfolgend mit einem primären monoklonalen Maus α-Myc-9B11 Antikörper bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wird die Membran für 60 min mittels Waschpuffer gewaschen und anschließend für 120 min mit einem sekundären horseradish Peroxidase (HRP) α-Maus Antikörper inkubiert. Danach erfolgt ein 60-minütiger Waschschrift. Zur Detektion der Banden auf die

Nitrocellulose-Membran wird das Pierce™ Enhanced chemiluminescence (ECL) Kit (Thermo Scientific, USA) verwendet. Danach wird der Röntgenfilm (Fuji Film, Japan) entwickelt. Die Expositionszeit liegt hierbei bei 2 Minuten. Die Detektion von *SLC22A9/OAT7* erfolgt entsprechend dem o.g. Vorgehen, jedoch unter Verwendung von 100 µg Protein des Zelllysats.

Tabelle 17: Verwendete Puffer. Folgende Abkürzungen werden verwendet: SDS; Natrium-Dodecylsulfat, Tris; Tris(hydroxymethyl)aminomethan.

Puffer	Molarität [M] Prozentualer Anteil [%]	Chemikalien
4x Lämmli-Puffer	0,2 M 40 % 16 % 20 % 0,02 %	Tris pH 6,8 Glycerol SDS β-Mercaptoethanol Bromphenolblau in dH ₂ O

Tabelle 18: Verwendet Puffer und Lösungen zur Herstellung eines Polyacrylamidgels. Folgende Abkürzungen werden verwendet: APS; Ammonium peroxodisulfate, TEMED; N,N,N',N'-tetramethylethylene diamine.

Gel	Volumen [ml]	Lösungen
Sammelgel 5 %	5 ml	H ₂ O
	5 ml	Sammelgelpuffer
	10 ml	20 % Gellösung
	0,02 ml	TEMED
	0,2 ml	10 % APS
Trenngel, 10 %	6 ml	H ₂ O
	3 ml	Trenngelpuffer
	3 ml	20 % Gellösung
	0,012 ml	TEMED
	0,012 ml	10 % APS
	0,02 ml	Bromphenolblau

Tabelle 19: Verwendete Puffer. Folgende Abkürzungen werden verwendet: NaCl; Natriumchlorid, KCL; Kaliumchlorid, Na₂HPO₄; Dinatriumhydrogenphosphat, KH₂PO₄; Kaliumdihydrogenphosphat.

Puffer	Molarität [M], Volumen [ml], prozentualer Anteil [%]	Chemikalien
10x PBS	1,37 M 0,027 M 0,125 M 0,018 M	NaCL KCL Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O KH ₂ PO ₄ Auf 1 l destilliertem Wasser auffüllen und auf pH 7,4 einstellen
Waschpuffer	1x PBS 0,03 %	10x PBS Tween Auf 1 l destilliertem Wasser auffüllen
Sammelgelpuffer	0,5 M 0,4 %	Tris-HCL pH 6,80 SDS Auf 0,25 l destilliertem Wasser auffüllen
Trenngelpuffer	1,5 M 0,4 %	Tris 8,80 SDS Auf 0,5 l destilliertem Wasser auffüllen
20 % Gellösug	100 ml 100 ml	40% Acrylamid-Bis destilliertes Wasser
Blockierungspuffer	5 % 0,3 %	Milchpulver Tween 20 Auf 1 l PBS auffüllen
Laufpuffer	1,92 M 0,25 M 1 %	Glycin Tris SDS Auf 2 l destilliertem Wasser auffüllen
Transferpuffer	10 %	Methanol Auf 0,1 l 1x Laufpuffer auffüllen

2.2.14 Serielle Verdünnung und Generierung einer homogene Zelllinie

Zur Generierung einer homogenen Zelllinie mit Überexpressionsklonen wird entsprechend dem Protokoll von Bokulić et al., 2022 vorgegangen. Hierzu werden die Zellen in eine T25 Flasche aufgetaut und bei bestehender 90 % Konfluenz mittels der Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,100 mm; 0,0025 mm²) (In-vitro diagnostica Marienfeld, Deutschland), sowie unter Verwendung von Tryptophanblau (Sigma, USA) ausgezählt. Auf einer 96er-multi-well-Platte werden je 10.000 Zellen in jedes well der Reihen A1 – A12 ausgesät. Anschließend erfolgt eine 1:10 Verdünnung bis zum Erhalt von 1 Zelle/well. Letzteres wird erneut verdünnt, sodass auf einer weiteren Verdünnungsplatte nur 0,3 Zellen/well vorhanden sind. Im weiteren Verlauf werden konfluente Klone expandiert und Kryostocks angefertigt. Die Lagerung der Zellen erfolgt bei -80 °C (NationalLab, Deutschland) oder -140 °C (NationalLab, Deutschland).

2.2.15 Immunfärbung und Zellzählung

Mittels einer Immunfärbung kann eine Detektion und Lokalisierung von Transportproteinen innerhalb einer Zelle erfolgen. Hierbei wird in jedes well einer 24er-multi-well-Platte ein Deckglas platziert und die stabil transfizierten MDCK1-Zellen hinzu pipettiert. Die Zellen werden bis zum Erreichen einer 90 % Konfluenz bei 37 °C inkubiert. Es erfolgt ein Mediumwechsel mit anschließendem Waschschrift unter Verwendung von PBS. Danach werden die Zellen für 15 min mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) (Carl Roth GmbH, Deutschland), sowie bei Raumtemperatur inkubiert. PFA wird verworfen und die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Die nachfolgende Permeabilisierung erfolgt für 5 min bei Raumtemperatur und mit 0,25 % (v/v) Triton™ X-100 (PanReac, Deutschland)/PBS (Tab. 20; Tab. 21). Der Überstand wird verworfen und unspezifische Bindestellen mit einer BSA (Tab. 20). Blockierungslösung wird verworfen und die Zellen mit einer primären Antikörperlösung über Nacht bei 4 °C inkubiert (Tab. 21). Für die Immunfärbung werden α -PDI, α -Lamp1 und α -Ecad-Decma-1 verwendet. Am Folgetag werden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und in einer Antikörperlösung bestehend aus sekundären Antikörpern für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert (Tab. 21). Alle nachfolgenden Schritte erfolgen in Dunkelheit, um Bleaching-Effekte zu reduzieren.

Anschließend werden weitere Waschschritte mit PBS vorgenommen. Das Eindecken der Klone auf die Objektträger erfolgt mit dem Eindeckmedium Fluoromount-G™ (Thermo Fisher Scientific, USA). Der Vorteil von Fluoromount-G™ besteht hierbei in einem geringen Photobleaching, wodurch die Immunfluoreszenzfärbung verbessert wird. Der Vorteil von Fluoromount-G™ besteht in der langfristigen Stabilität und Kompatibilität mit verschiedenen Farbstoffen, sowie dem geringen Photobleaching, wodurch die Immunfluoreszenzfärbung verbessert wird.

Tabelle 20: Verwendete Puffer für die Immunfärbung von Überexpressionsklonen.

Puffer	Prozentualer Anteil [%]	Chemikalien
Permeabilisierungslösung	0,25 % Triton™ X-100	0,25 g Triton auf 100 ml 1x PBS
Blockierungslösung	10 % BSA	10 g BSA auf 100 ml 1x PBS
Anikörperlösung	3 % BSA	3 g BSA auf 100 ml 1x PBS
10x PBS	1,37 M 0,027 M 0,125 M 0,018 M	NaCL KCL Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O KH ₂ PO ₄ Auf 1 l destilliertem Wasser auffüllen und auf pH 7,4 einstellen

Tabelle 21: Verwendete Antikörper und Fluorochrome. Folgende Abkürzungen werden verwendet: IHC; Immunhistochemie, WB; Western-blot, Mono; Monoklonal, Poly; Polyklonal, PV; Parvalbumin, CR; Calretinin, CB; Calbindin, WFA; *Wisteria floribunda* Agglutinin, NeuN; neuronaler Nukleus, PDI; Protein disulfid Isomerase, Lamp1; Lysosomal assoziiertes Membranprotein 1, E-Cadherin; Epitheliales Cadherin, DAPI; 4',6-Diamidino-2-phenylindol, HRP; horseradish Peroxidase.

Primäre Antikörper/ Katalog-nr.	Ursprung/ Klonalität	Verdünnung IHC	Verdünnung WB	Hersteller, Land
α-CR (CR7697)	Kaninchen (poly)	1:1000	/	Swant, Schweiz

α -PV (PV235)	Maus (mono)	1:3000	/	Swant, Schweiz
α -NeuN (MAB377)	Maus (mono)	1:100	/	Millipore, USA
α -CB (CB38a)	Kaninchen (mono)	1:1000	/	Swant, Schweiz
α -Flag M2 (F1804)	Maus (mono)	/	1:1000	Sigma Aldrich, USA
α -Myc-9B11 (mAb2276)	Maus (mono)	1:500	1:1000	Cell signaling, USA
α -PDI (SPA890)	Kaninchen (poly)	1:100	/	Enzo, USA
α -LAMP1 (CD107a)	Kaninchen (poly)	1:100	/	Merck, Deutschland
α -Ecad- Decma-1 (U3254)	Ratte (mono)	1:1500	/	Sigma, USA

Sekundäre Antikörper	Ursprung	Verdünnung IHC	Verdünnung WB	Hersteller, Land
Alexa goat α -Maus 594 (AB2338894)	Ziege (poly)	1:1000	/	Jackson ImmunoResearch, USA
Alexa goat α -Ratte 488 (AB2338355)	Ziege (poly)	1:1000	/	Jackson ImmunoResearch, USA
Alexa goat α -Kaninchen 594 (AB2338060)	Ziege (poly)	1:1000	/	Jackson ImmunoResearch, USA
Alexa goat α -Maus 488 (AB2338854)	Ziege (poly)	1:1000	/	Jackson ImmunoResearch, USA
Alexa goat α -Kaninchen 488 (AB2338047)	Ziege (poly)	1:1000	/	Jackson ImmunoResearch, USA

HRP goat α - Ziege (poly) Maus (115035003)	/	1:15000	Jackson ImmunoResearch, USA
---	---	---------	-----------------------------------

Fluochrome		Verdün- nung ICH	Hersteller
DAPI (D9542) /		1:1000 /	Sigma, USA
Fluoromyelin (F34652)		1:300 /	Invitrogen, USA
WFA / (L32481)		1:300	Invitrogen, USA

Die Quantifizierung der Klone wird dann mittels dem Apotome-2-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Deutschland) durchgeführt. Zur Zellzählung wird das 20x-Objektiv verwendet, während die Quantifizierung mit ImageJ (ImageJ-win64) erfolgt. Klone, die eine α -Myc-9B11-positive Immunmarkierung zeigen und bei welchen die Zellen ≥ 90 %, exprimiert werden, können entsprechend dem o.g. Vorgehen erneut und unter Inklusion weitere Antikörper wie α -Ecad Decma-1, α -PDI und α -Lamp1, gefärbt werden. Zur Aufnahme der Bilder wird das 63x-Öl-Objektiv (Zeiss Apotome 2, Deutschland) verwendet. Es erfolgt ein Intervall-Z-Stack mit einem pitch von 0,24 μ m. Überdies erfolgt eine maximum Projection und Deconvulusion Prozessierung.

2.2.16 Bestimmung der Zellzahl und Aufnahme-Assay Vorbereitungen

Zur Vorbereitung des Aufnahme-Assay werden die Zellen mit 2,5 % (10x) Trypsin trypsinisiert (Gibco, USA), sowie die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer (Marienfeld, Deutschland) bestimmt. Anschließend werden die Klone mit einer unterschiedlichen Startzellzahl (5.000, 10.000, 15.000, 20.000, 30.000 und 45.000 Zellen pro well) in einer 24er-multi-well-Platte ausplattiert. Nach 72 h Inkubation bei 37 °C wird die Konfluenz der Zellen unter einem Lichtmikroskop (Zeiss, Deutschland) analysiert. Hierdurch kann bestimmt werden, welche Anfangszellzahl erforderlich ist, damit nach 72 Stunden eine Konfluenz von 90 % erreicht werden kann.

2.2.17 Adsorptionschromatografie von radioaktiven-Jodverbindungen

Das in dieser Arbeit vorgenommene Isotopenexperiment erfolgt gemäß den gesetzlichen Bestimmungen der Strahlenschutzverordnung (StrlSchV). Die Aufreinigung von radioaktiven-Jodverbindungen wird mittels Adsorptionschromatografie durchgeführt (Tab. 22; Tab. 23). Hierzu wird eine Säule mit inkludiertem Filterpapier in ein Reagenzglas transferiert und zur Äquilibration 600 µl Sephadex (Pharmacia, Schweden) hinzugegeben. Danach wird die Säule vollständig mit 0,1 mM HCL befüllt und der Durchfluss verworfen. Nachfolgend wird das radioaktive Isotop auf die Säule pipettiert und diese dann vollständig mit 0,1 mM HCL befüllt. Der Durchfluss wird verworfen und ddH₂O hinzugegeben und erneut verworfen. Danach wird die Säule in ein neues Reagenzglas überführt. Anschließend erfolgt eine Eluierung mit 1 ml EtOH:NH₃. Nachfolgend wird ein Wasserbad vorbereitet, welches auf einer Heizplatte bei 65 °C (Scientific, Deutschland) erhitzt wird. Das Reagenzglas wird hineingestellt und kontinuierlich Stickstoffgas (Linde, Deutschland) zugeführt. Das Eluat wird in das Reagenzglas eingetrocknet und die Jodid-Moleküle herausgelöst. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C in einem verstärkten Bleibehälter.

Tabelle 22: Verwendete Isotope, spezifische Aktivität, Gesamtaktivität und Hersteller.

Isotop	Spezifische Aktivität [MBq/g]	Gesamtaktivität [MBq]	Hersteller, Land
¹²⁵ I-TRIAC	0,0074	5,55 MBq	Hartmann Analytics, Deutschland
¹²⁵ I-TETRAC	0,0090	6,89 MBq	Hartmann Analytics, Deutschland
¹²⁵ I-T4	0,0084	4,2 MBq	Perkin Elmer, USA
¹²⁵ I-T3	0,0106	5,3 MBq	Perkin Elmer, USA
¹²⁵ I-rT3	0,009	6,89 MBq	Perkin Elmer, USA

Tabelle 23: Verwendete nicht-radioaktive Komponenten mit Lösungsmittel und Stockkonzentration.

Nicht-radioaktive Komponenten	Lösungsmittel	Stockkonzentration [M]	Hersteller, Land
TRIAC	MeOH	0,08 M	Merck Deutschland
Sobetirome	DMSO	0,03 M	Merck/Sigma, Deutschland, USA
DITPA	DMSO	0,098 M	Biozol/MedChemExpress, Deutschland
ES	Methanol	0,025 M	Merck/Sigma, Deutschland, USA
NBTI	DMF	0,095 M	Sigma Aldrich Chemie GmbH, USA

2.2.18 Endpunkt-Assay, sowie Zeit- und Konzentrationsabhängiges ¹²⁵I-TRIAC Aufnahme-Assay

Zeitabhängige Aufnahme-Assay erfolgen zu unterschiedlichen Messzeitpunkten (1 min, 2 min, 3 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min) und in voneinander unabhängigen Experimenten. Ein Endpunkt-Assay hingegen bezieht sich auf nur einen gemessenen Zeitpunkt, welcher wahlweise bei 3 min, 5 min oder 15 min festgelegt wird. Bei einer Konkurrenz mit nicht-radioaktiven Substanzen wird ein Endpunkt-Assay vorgenommen, welches neben der Resuspension der radioaktiven-Jodverbindung in Medium auch den jeweiligen nicht-radioaktiven Kompetitor inkludiert. Die Experimente erfolgen in Duplikaten und unter Verwendung von verschiedenen Klonen.

Zunächst wird die radioaktive-Jodverbindung in einem Nährmedium (ohne FCS/Antibiotika) resuspendiert und anschließend 300 µl radioaktives Medium auf die konfluenten Zellen der 24er-multi-well-Platte gegeben. Danach werden die Klone zeitabhängig oder Konzentrationsabhängig bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird auf Eis gestoppt und das radioaktive Medium verworfen. Anschließend werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 500 µl einer 40 mM NaOH Lösung lysiert, sowie weiterhin für 30 min

bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler (Scientific Industries, USA) inkubiert. Abschließend wird die Zelllösung in ein Messröhrchen transferiert und mittels Gammazähler (Berthold Technologies, Deutschland), sowie der implementierten LBIS Software von Berthold Technologies analysiert. Als Lösungsmittelkontrolle fungieren untransfizierte MDCK1-Zellen, welche nur mit dem Vehicel/Lösungsmittel behandelt werden. Letzteres ermöglichte das poolen von Daten unabhängiger Experimente. Die erhaltenen cpm-Werte werden mittels einer Excel Tabelle ausgewertet und zu einem Graphen (GrapPad Prism Ver. 10.1.0) kombiniert.

2.3.1 Merkmale von Mausmodellen des Allan-Herndon-Dudley-Syndroms

Zur Untersuchung der Auswirkungen eines MCT8-Defekts in Patienten wird in der hier vorliegenden Arbeit mit drei repräsentativen Mausmodellen gearbeitet, die jeweils die korrespondierende Punktmutation zur humanen MCT8-Mutation aufweisen. Die Generierung der genom-editierten Mct8 Mäuse erfolgt durch Prof. Dr. Frédéric Flamant vom Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, wobei mittels CRISPR/CAS9 jeweils ein einzelner Basenaustausch im genomischen Mct8-Locus vorgenommen wird. Anschließend werden die generierten Mausmodelle für das hier vorliegende Projekt durch den Kooperationspartner zur weiteren Charakterisierung zur Verfügung gestellt.

Das in dieser Arbeit dargestellte Projekt ist vom zuständigen Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz in Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) genehmigt und wird bei der Ethikkommission unter dem Aktenzeichen 81-02.04. 2019. A144 geführt. Die hierbei verwendeten Mäuse werden im Haus für experimentelle Therapie in Bonn gehalten (Tab. 24). Die Haltung erfolgt vorschriftsmäßig unter SPF-Bedingungen, während der Gesundheitszustand täglich durch Tierpfleger überprüft wird. Tiere, die Anzeichen von Schmerzen, Leid oder etwaigen Beeinträchtigungen zeigen, werden gemäß den geltenden Vorschriften für Versuchstiovorhaben eingeschläfert. Die Haltung erfolgt in Zuchtkäfigen mit standardisiertem 12 h :12 h Tages- und Nachtrhythmus, sowie normierten klimatischen Bedingungen. Alle Tiere haben freien Zugang zu Wasser und Nahrung. Die Entwöhnung vom Muttertier erfolgt nach 4-Wochen. Zur eindeutigen Zuordnung der Mäuse werden Ohrlochmarkierungen vorgenommen.

Tabelle 24: Verwendete murine Mct8-Mausmutanten und korrespondierende humanpathogene MCT8-Punktmutationen in Patienten. Es besteht ein Unterschied zwischen der murinen und humanen Schreibweise. Folgende Abkürzungen werden verwendet: WT; Wildtyp.

mMct8	hMCT8	Punktmutation, knock-out
Mct8 ^{+/y}	MCT8 ^{+/y}	/
Mct8 ^{L366W/y}	MCT8 ^{L434W/y}	Leucin → Tryptophan
Mct8 ^{L223R/y}	MCT8 ^{L291R/y}	Leucin → Arginin
Mct8 ^{P253L/y}	MCT8 ^{P321L/y}	Prolin → Leucin
Mct8 ^{P253L/y} ;Oatp1c1 ^{-/-}	/	Prolin → Leucin Oatp1c1 ^{-/-}

2.3.2 Präparation von Mäusen zur Durchführung von immunhistologischen Experimenten zum MCT8-Defekt

Zur Präparation von 28-Tagen alten Mäusen wird eine Euthanasie durchgeführt. Anschließend können die biometrischen Parameter Körperlänge und Gewicht erhoben, als auch eine Schwanzbiopsie zur späteren Genotypisierung vorgenommen werden. Danach erfolgt eine Thoraktomie bei welcher eine sterile Einwegkanüle als Zugang zum rechten Herzventrikel gelegt wird. Danach wird die Maus mit PBS, sowie anschließend mit 4 % (w/v) PFA (Roth, Deutschland) perfundiert. Nachfolgend wird der Kopf abgetrennt und das Gehirn von der Schädelbasis gelöst. Letzteres wird in 4 % (w/v) PFA transferiert und über Nacht bei 4 °C fixiert. Am Folgetag werden die Gehirne mit PBS gewaschen und für 48 h bei 4 °C, sowie einer 30 % (w/v) Zuckerlösung (PanReac, Deutschland) zur Kryoprotektion überführt. Abschließend werden die Gehirne für 30 sek in Isopentan (PanReactAppliChem, Deutschland) heruntergekühlt, sowie folglich bei -80 °C gelagert (NationalLab, Deutschland).

2.3.3 Genotypisierung und DNA-Verdau

Die eindeutige Zuordnung des Genotyps von Mäusen kann mittels Genotypisierung erfolgen. Die Genotypisierung wird durch Entnahme von Schwanzbiopsien vorgenommen, welche in 100 μ l alkalischen Puffer überführt werden (Tab. 25; Tab. 26; Tab. 27, Tab. 28). Danach kann eine Inkubation für 30 min bei 95 °C und 300 rpm im Thermomixer (Eppendorf, Deutschland) erfolgen. Der DNA-Verdau wird durch Zugabe von 100 μ l Neutralisierungspuffer terminiert. Des Weiteren werden PCR-Ansätze angefertigt und auf ein 2 % (w/v) Agarosegel aufgetragen. Das Gel läuft für 45 min bei einer elektrischen Spannung von 125 V und 300 mA (Consort, Belgien). Als Marker fungiert der GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, während der 6x orange G < 200 kb Loading dye den PCR-Proben hinzugegeben wird.

Tabelle 25: Verwendeter PCR-Ansatz zur Genotypisierung der Mauslinien.

Genotypisierung von Mct8^{L223R/y} Mausmutanten			
Komponenten	Volumen [μl]	Komponenten	Volumen [μl]
cDNA	1 μ l	cDNA	1 μ l
10x DNA-Polymerase Buffer	1,5 μ l	10x DNA-Polymerase Buffer	1,5 μ l
dNTP-Mix 5mM	0,35 μ l	dNTP-Mix 5mM	0,35 μ l
fwd. Primer 10 μ M SM1901	1 μ l	fwd. Primer 10 μ M SM1901	1 μ l
rev. Primer 10 μ M SM1904	1 μ l	rev. Primer 10 μ M SM1903	1 μ l
Taq Genaxxon DNA-Polymerase	0,5 μ l	Taq Genaxxon DNA-Polymerase	0,5 μ l
H ₂ O	9,65 μ l	H ₂ O	9,65 μ l
Σ	15 μ l	Σ	15 μ l
Genotypisierung von Mct8^{L366W/y} Mausmutanten			
Komponenten	Volumen [μl]	Komponenten	Volumen [μl]
cDNA	1 μ l	cDNA	1 μ l

10x DNA-Polymerase Buffer	1,5 µl	10x DNA-Polymerase Buffer	1,5 µl
dNTP-Mix 5mM	0,35 µl	dNTP-Mix 5mM	0,35 µl
fwd. Primer 10 µM SM1905	0,5 µl	fwd. Primer 10 µM SM1905	0,5 µl
rev. Primer 10 µM SM1908	1 µl	rev. Primer 10 µM SM1907	1 µl
Taq Genaxxon DNA-Polymerase	0,5 µl	Taq Genaxxon DNA-Polymerase	0,5 µl
H ₂ O	10,15 µl	H ₂ O	10,15 µl
Σ	15 µl	Σ	15 µl

Genotypisierung von Mct8^{P253L/y} Mausmutanten

Komponenten	Volumen [µl]	Komponenten	Volumen [µl]
cDNA	3 µl	cDNA	3 µl
10x DNA-Polymerase Buffer	3 µl	10x DNA-Polymerase Buffer	3 µl
dNTP-Mix 5mM	0,7 µl	dNTP-Mix 5mM	0,7 µl
fwd. Primer 10 µM SM1605	2 µl	fwd. Primer 10 µM SM1601	3 µl
rev. Primer 10 µM SM1607	2 µl	rev. Primer 10 µM SM1603	3 µl
Taq Genaxxon DNA-Polymerase	1 µl	Taq Genaxxon DNA-Polymerase	0,8 µl
H ₂ O	18,3 µl	H ₂ O	15,9 µl
Σ	30 µl	Σ	15 µl

Tabelle 26: Verwendete Primer und Sequenzen.

Herkunft, Primer	Sequenzen
Fwd. mSM1901	5' GGTTTCAGAGGTTCCCTATCTG 3'
Rev. mSM1903	5' GTAGTGGCCCAGAAATCACGC 3'
Rev. mSM1904	5' GTAGTGGCCCAGGATGACGA 3'
Fwd. mSM1601	5' AGGTTGGTGGCGAGTGTGG 3'
Rev. mSM1603	5' TATCCCCCAGCATTTTAATTAATAAAA 3'
Fwd. mSM1605	5' AGGTTGGTGGCGAGTGTGG 3'
Rev. mSM1607	5' TATCCCCCAGCATTTTGATGAGGAA 3'
Fwd. mSM1905	5' GAGGACTTGGAAGTGTCTAGCCC 3'
Rev. mSM1907	5' GTAGCCCCAATGCATACCCAC 3'

Rev. mSM1908

5' GTAGCCCCAATGCACACCAAG 3'

Tabelle 27: Verwendetes PCR-Protokoll.

PCR Schritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Zyklen
Initial Denaturation	180	95	
Denaturierung	30	95	10x
Annealing	30	68	
Elongation	30	72	
Denaturation	30	95	35x
Annealing	30	58	
Elongation	30	72	
Hold		72	

Tabelle 28: Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer	Molarität [M]	Chemikalien
Alkalischer-Puffer	0,5 M	EDTA, pH 8.0 ad dH ₂ O pH 12
Neutralisierungspuffer	1 M	TRIS-HCL pH 6.8 ad H ₂ O pH 3

2.3.4 Immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten

Zur Untersuchung histologischer Veränderungen im Gehirn von Mct8-Mausmutanten werden immunhistologische Fluoreszenzfärbungen vorgenommen. Mittels einem Kryotom (Leica, Deutschland) werden Frontalschnitte der perfundierten und in optimal cutting temperature (OCT) Medium eingedeckten Gehirne vorgenommen. Die hierbei verwendete Schnittstärke beträgt 35 µm. Parallel wird eine 24er-multi-well-Platte mit kaltem PBS befüllt und die Serienschnitte werden in je 1 well der multi-well-Platte gegeben. Nachfolgend erfolgt eine free floating Färbung, bei welcher die Schnitte zunächst für 10 min mit 0,5 % (v/v) Triton™ X-100 (PanReac, Deutschland) permeabilisiert, sowie anschließend mit PBS gewaschen werden (Tab. 29; Tab. 30). Die

Blockierung unspezifischer Bindestellen erfolgt für 1 h in einer Blockierungslösung. Diese wird verworfen und die Gewebeschnitte über Nacht in einer primären Antikörperlösung bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert (siehe auch Tab. 21). Für die Immunfärbung werden α -PV, α -CR, α -CB, α -NeuN Antikörper, sowie WFA und Fluoromyelin verwendet (siehe auch Tab. 21). Am Folgetag werden die Gehirne mit PBS gewaschen und eine sekundäre Antikörperlösung hinzugegeben (siehe auch Tab. 21). Alle Weiteren experimentellen Schritte erfolgen lichtgeschützt, um Bleaching-Effekte zu reduzieren. Es erfolgt eine 2-stündige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgen weitere Waschschrte mit PBS. Die abschließende Eindeckung der Gewebeschnitte auf Objektträger wird mittels Fluoromount-G™ (Thermo Fisher Scientific, USA) vorgenommen. Zur Auswertung der Schnitte wird das Keyence-Fluoreszenzmikroskop (Keyence-BZ-X810, Deutschland) verwendet. Mittels diesem wird ein pseudo-Z-Stack gemacht und zur Auswertung wahlweise ein 40x- oder 20x-Objektiv verwendet. Im Nachgang erfolgt ein Sticking, welches über die implementierte BZ-X800 Software des Keyence ermöglicht wird. Die Quantifizierung der Daten erfolgt unter Verwendung der open-source Software CellProfiler (windows Ver. 4.2.4), sowie ImageJ (ImageJ-win64). Mittels einer eigens generierten Pipeline erkennt CellProfiler die zu untersuchenden Interneuronen als Objekte und definiert diese entsprechend. Nachfolgend kann die Zellzahl und Fluoreszenzintensität (Objektintensität) bestimmt werden.

Tabelle 29: Verwendete Puffer zur Kryokonservierung.

Puffer	Molarität [M], Prozentualer Anteil [%]	Chemikalien
Zuckerlösung	30 %	Sucrose Ad 1x PBS, pH 7,4
4 % PFA	0,033 M	Formaldehyd Ad 25 ml 1x PBS, pH 7,4

Tabelle 30: Verwendete Puffer für die Immunfärbungen.

Puffer	Prozentualer Anteil [%]	Chemikalien
Permeabilisierungslösung	0,5 % Triton™ X-100	0,25 g Triton mit 0,1 l 1x PBS auffüllen
Blockierungslösung	0,1 % Triton™ X-100, 5 % BSA	5 g BSA auf 0,1 % Triton/PBS auffüllen
Anikörperlösung	0,05 % Triton™ X-100, 2,5 % BSA	2,5 g BSA auf 0,05 % Triton/PBS auffüllen

Die hier verwendeten Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe (siehe auch Tab. 21) werden häufig in der Literatur zur Untersuchung der Auswirkungen eines MCT8-Defekts in Mausmodellen verwendet. Insbesondere PV, CR und CB sind Interneuronen, welche von physiologischen T3-Werten im Gehirn abhängen und sensitiv auf einen T3-Mangel reagieren. Überdies sind T3-abhängige Gene essenziell für Myelinisierungsprozesse im Gehirn, wodurch eine physiologische Signalweiterleitung gewährleistet werden kann. WFA ist ein neuer und indirekter potenzieller Marker für einen T3-Mangel, da mittels WFA Bestandteile des perineuronale Netz (PNN) detektiert werden können, welches insbesondere PV-positive Zellen umgibt. Letzteres ist insbesondere in der S1BF-Region lokalisiert und in hoher Dichte vorzufinden, weshalb in der Literatur insbesondere die S1BF-Region zur histologischen Untersuchung von PV-positiven Zellen bei einem MCT8-Defekt hinzugezogen wird.

2.3.5 Isolierung spezifischer Gehirnregionen

Mittels der Isolierung ausgewählter Gehirnregionen aus Mäusen ist es möglich, spezifische Gene in unterschiedlichen Gehirnregionen auf deren Expression zu untersuchen.

Die Präparation der Mausgehirne kann mittels Dekapitation erfolgen, während das Gehirn im Anschluss von der Schädelbasis gelöst wird. Danach wird das Gehirn mit kaltem PBS gewaschen und in eine metallische Maus-Gehirn-Matrix platziert. Danach wird das Cerebellum vom Kortex getrennt und die Medulla Oblongata verworfen. Anschließend

werden mittels der Matrix akut-frontal Schnitte des Gehirns in einem Abstand von 1 μm angefertigt. Die Schnitte werden in kaltes PBS transferiert und der Hippocampus von anterior nach posterior mit der Pinzette isoliert. Zuzüglich erfolgt die Isolierung des Cerebellums. Die Gewebeproben werden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.3.6 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA kann mittels Trizol erfolgen (Ambion, USA). Es werden 1 ml Trizol (Ambion, USA) pro 50-100 mg Gewebe zu den Gewebeproben hinzugegeben und nachfolgend homogenisiert. Es erfolgt eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Danach werden 0,2 ml Chloroform (PanReac, Deutschland) dazu pipettiert und die Eppendorf-Tubs für 15 sek invertiert, mit anschließender 3-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Des Weiteren erfolgt eine 15-minütige Zentrifugation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $12000 \times g$ (Eppendorf, Deutschland). Danach wird die wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Tube transferiert. Nachfolgend werden 0,5 ml Isopropanol (PanReac, Deutschland) hinzugegeben und die Proben gevortext (peqLab, Deutschland). Zur Präzipitation werden die Proben für weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, sowie anschließend für 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $12000 \times g$ zentrifugiert (Eppendorf, Deutschland). Der Überstand wird verworfen und das Pellet mittels 75 % (v/v) Ethanol zur Entfernung von restlichen Salzen und Phenol mehrmals gewaschen. Das Pellet wird dann für 15 min luftgetrocknet.

Die Überprüfung der Reinheit der RNA, sowie dessen Konzentrationsbestimmung erfolgt über eine OD-Messung am Nanodrop (ThermoScientific, USA) und mittels der Nanodrop 2000/2000c Software. Proben mit einem A_{260}/A_{280} OD-Verhältnis von 1,8 – 2,1, sowie einem A_{260}/A_{230} OD-Verhältnis von 2,0 – 2,2 werden weiterverwendet.

2.3.7 RNA-Gel

Die Überprüfung der RNA-Integrität kann mittels einem denaturierenden RNA-Gel erfolgen. Hierzu werden 0,72 g Agarose in 72 ml A. dest gelöst und aufgeköcht. Danach werden 18 ml Formaldehyd, sowie 10 ml Mops-Puffer aus einem 10x Mops-Puffer Stock hinzugegeben (Tab. 31). Zur Detektion des Gels werden 3 µl des Ethidium-Bromid Ersatz HD-Green Plus DNA Stain (Intas, Deutschland) hinzu pipettiert.

Zur Vorbereitung der RNA-Proben werden diese zunächst für 5 min bei 65 °C denaturiert und anschließend für 2 min auf Eis gekühlt. Danach werden die Geltaschen mit je 3000 ng der RNA-Probe beladen. Das Gel läuft für 2 h bei einer Spannung von 70 V und einer Stromstärke von 300 mA in 1x Mops-Puffer, welcher als Laufpuffer fungiert.

Tabelle 31: Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer	Molarität [M]	Chemikalien
10x Mops-Puffer	0,01 M	EDTA, pH 8.0
	0,08 M	Na-Ac
	0,2 M	Mops, pH.7,0
		Auf 1 l destilliertem Wasser auffüllen

2.3.8 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese kann mittels einem iScript™ cDNA-Synthesis Kit (Biorad, USA) erfolgen (Tab. 7; Tab. 8). Als template fungiert 1 µg RNA (Tab. 32; Tab.33).

Tabelle 32: Verwendeter Ansatz zur cDNA-Synthese.

Komponenten	Volumen pro Reaktion [µl]
5x iScript Reaction Mix	4 µl
iScript Reverse Transcriptase	1 µl
Nuklease-freies Wasser	variabel
RNA	1 µg

Σ 20 µl

Tabelle 33: Verwendetes cDNA-Synthese Protokoll.

Inkubationsschritt	Zeit [sek]	Temperatur [°C]
Priming	300	25 °C
Reverse Transkription	1200	46 °C
Raumtemperatur Inaktivierung	60	95 °C
Hold	/	4 °C

2.3.9 Quantitative Echtzeit-PCR

Mittels einer quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) kann eine Genexpressionsanalyse vorgenommen werden. Hierdurch ist es möglich, verschiedene Gene in *Mct8*-Mausmutanten auf Unterschiede im Vergleich zum WT zu untersuchen.

Es erfolgt eine qPCR von *Mct8*, *Dio1*, *Dio2* und *Aldh1a1* in *Mct8*^{L223R/y} und *Mct8*^{+y} Mäusen. *18s*-RNA fungiert hierbei als housekeeping-Gen. Der Negativkontrolle wird anstelle von DNA, Nuklease-freies Wasser hinzugefügt (Tab. 34; Tab. 35; Tab. 36). Zunächst werden alle Proben, welche aus der cDNA-Synthese erhalten werden, 1:5 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Ebenfalls werden alle Primer (Eurogentec, Belgien) 1:10 aus der Stocklösung (100 µM) verdünnt, sodass eine 10 µM Arbeitslösung erhalten wird. Die Proben werden in eine 96er-Platte pipettiert und die Zielsequenz mittels dem Realplex² (Eppendorf, Deutschland) amplifiziert.

Tabelle 34: Verwendeter Ansatz für die qPCR.

Komponenten	Volumen pro Reaktion [µl]	Komponenten	Volumen pro Reaktion [µl]
Nuklease-freies Wasser	7,1 µl	Nuklease-freies Wasser	7,3 µl
Takyon	10 µl	Takyon	10 µl
Fwd. Primer	0,2 µl	Fwd. Primer <i>18s</i>	0,1 µl
Rev. Primer	0,2 µl	Rev. Primer <i>18s</i>	0,1 µl
cDNA	2,5 µl	cDNA	2,5 µl
Σ	20 µl	Σ	20 µl

Tabelle 35: Verwendete Primer und Sequenzen zur Genotypisierung.

Herkunft, Primer	Sequenzen
Fwd. <i>mSLC16a2</i>	5' ATGGTTGAAAGGCGAATGAG 3'
Rev. <i>mSLC16a2</i>	5' AGTGGAGTTCCAAGCAGCAT 3'
Fwd. <i>mDio2</i>	5' ACACTGGAATTGGGAGCATC 3'
Rev. <i>mDio2</i>	5' CTCCTGGCGCTCTATGACT 3'
Fwd. <i>mDio1</i>	5' CACAGCCGATTTCTCATCA 3'
Rev. <i>mDio1</i>	5' GCTGCTCTGGTTCTGCATTG 3'
Fwd. <i>mAldh1a1</i>	5' CATCCCGGATTTTTGTTGAG 3'
Rev. <i>mAldh1a1</i>	5' CACTCCAGTTTGGCTCCTTC 3'

Tabelle 36: Verwendetes qPCR Protocol.

Schritte	Zeit [sek]	Temperatur [°C]	Zyklen
Initial Denaturation	180	95	
Denaturation	15	95	
Annealing	20	60	40x
Initial Elongation	30	72	
Elongation	180	72	
Hold	/	4	

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von TRIAC-Transportern

3.1.1 siRNA-Screening potenzieller TRIAC-Kandidatengene

Ziel ist es, potenzielle TRIAC-Kandidatengene zu identifizieren, validieren und charakterisieren. Hierbei erfolgt das small-interfering-RNA (siRNA) -Screening durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Krause. Die TRIAC-Kandidatengene werden dann in der hier vorliegenden Arbeit weiter identifiziert, validiert und charakterisiert.

MCT8-Transportproteine sind in multiplen Organen, einschließlich der Blut-Hirn-Schranke, lokalisiert und essenziell für den Transport von Schilddrüsenhormonen. Erkrankungen, die auf Mutationen im MCT8-Transportprotein beruhen, sind als Allan-Herndon-Dudley Syndrom (AHDS) oder MCT8-Defizienz (MCT8^{-/-}) bekannt. Die Erkrankung zeigt eine charakteristische Pathologie, indem es zu einer Veränderung der Schilddrüsenhormonwerte im Blut kommt, woraus sich eine periphere Thyreotoxikose sowie eine Hypothyreose im Gehirn ergibt. Eine Behandlungsmöglichkeit besteht in der Einnahme von TRIAC. In diesem Kontext haben vergangene klinische Studien AHDS-Patienten mit TRIAC behandelt (TRIAC-Trial I and II: NCT02060474, NCT02396459). Die Behandlung führt dazu, dass weniger TSH aus der Hypophyse freigesetzt wird, wodurch sich die T3- und T4-Plasmawerte reduzieren. Daraus resultierend reduziert sich die T3-Akkumulation und somit das klinische Bild einer peripheren Thyreotoxikose. Die zugrundeliegenden Transportmechanismen, welche hierbei von TRIAC verwendet werden, sind bisher unbekannt. Zur Aufklärung der Transportmechanismen erfolgen experimentelle Untersuchungen und ein genomweites siRNA-Screening durch die Arbeitsgruppe (AG) von Prof. Dr. Krause und Dr. Protze am Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie (FMP) (Berlin, Deutschland) (Becker & Güth-Steffens et al., 2024). Die AG Krause hat in diesem Kontext potenzielle TRIAC-Kandidatengene eingegrenzt und *SLC29A2/ENT2*, *SLC22A9/OAT7*, sowie *ABCD1/ALDP* als potenzielle TRIAC-Transporter identifiziert.

Hierbei kann ein Hoch-Durchsatz-small-interfering-RNA (siRNA) Screen mit umfassender siRNA-Bibliothek vorgenommen werden. Die siRNA-Bibliothek umfasst das gesamte

menschliche Genom. Die AG hat zur Eingrenzung potenzieller Kandidatengene stabile Schilddrüsenhormonrezeptor (TR) -Reporter-Zelllinien basierend auf einem optimierten TR-transaktivierten Luciferase-Reportergen generiert und das dazugehörige Assay etabliert. Hierbei werden HepG2-Zellen, welche ein T3-Rezeptor abhängiges Luciferase-Reportergen stabil exprimieren, verwendet. Es erfolgt ein knock-down relevanter Transportproteine mittels siRNA, wodurch die Aufnahme von TRIAC und die damit einhergehende TR-Aktivierung verringert wird. Falls TRIAC nach knock-down eines spezifischen TRIAC-Kandidatengens unzureichend in die Zelle gelangt, so kann das Ausbleiben des Biolumineszenz-Signals durch das Luciferase Reportergen als Hinweis für ein potenzielles TRIAC-Kandidatengens fungieren (Abb. 11). Die Aufnahme von T3 und dessen Bindung am T3-Rezeptor mit resultierendem Biolumineszenz-Signal fungiert als Validierung und Kontrolle.

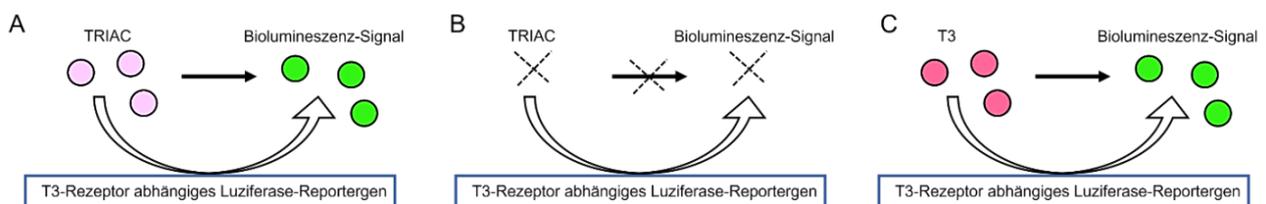


Abbildung 11: Schematische Darstellung des siRNA-Screenings zur Eingrenzung der potenziellen TRIAC-Kandidatengene *SLC29A2/ENT2*, *SLC22A9/OAT7* und *ABCD1/ALDP*. Ein knock-down eines nicht spezifischen Kandidatengens resultiert in einem Biolumineszenz-Signal (A). Wenn TRIAC nach einem knock-down eines spezifischen TRIAC-Kandidatengens unzureichend in die Zelle gelangt, so bleibt ein Biolumineszenz-Signal aus (B). T3 und dessen Bindung am T3-Rezeptor resultiert in einem Biolumineszenz-Signal und fungiert als Kontrolle (C). Nachfolgend werden Plasmide unter Verwendung des pCMV6-entry Vektorsystems und mit den jeweiligen Insertsequenzen von unserer Arbeitsgruppe eingekauft (adaptiert nach Becker & Güth-Steffens et al., 2024).

3.1.2 Generierung von Überexpressionsklonen zu den jeweiligen Kandidatengenen

Ziel ist es, Überexpressionsklone zu generieren, bei welchen ca. ≥ 90 % der Zellen die jeweiligen Kandidatengene exprimieren. Die Überexpressionsklone werden dann für weitere Aufnahme-Assay verwendet.

Hierbei werden zur weiteren experimentellen Untersuchung Madin-Darby-Canine-Kidney-1 (MDCK1)-Zellen verwendet, welche stabil mit den jeweiligen Kandidatengenen unter

Verwendung des pCMV6-entry Expressionsvektor transfiziert werden. Mittels serieller Verdünnung wird eine homogene Zelllinie von Überexpressionsklonen aus einer heterogenen Zellpopulation der jeweiligen Kandidatengene *SLC29A2/ENT2*, *SLC22A9/OAT7* und *ABCD1/ALDP* nach Bokulić et al., 2022 generiert.

Die generierten MDCK1-Klone exprimieren die jeweiligen Transportproteine *SLC29A2/ENT2*, *SLC22A9/OAT7* und *ABCD1/ALDP*, welche dann mittels einem monoklonalen Maus α -Myc-9B11 Antikörper (AK) detektiert werden können. Zur Durchführung radioaktiver Experimente werden Klone verwendet, bei welchen ca. $\geq 90\%$ der Zellen die jeweiligen TRIAC-Kandidatengene exprimieren (Abb. 12). Die Bestimmung des Grenzwerts erfolgt mittels Mikroskopie, bei welcher die jeweiligen Klone mittels einem 20x-Objektiv in eine gedachte horizontale und vertikale Linie unterteilt werden.

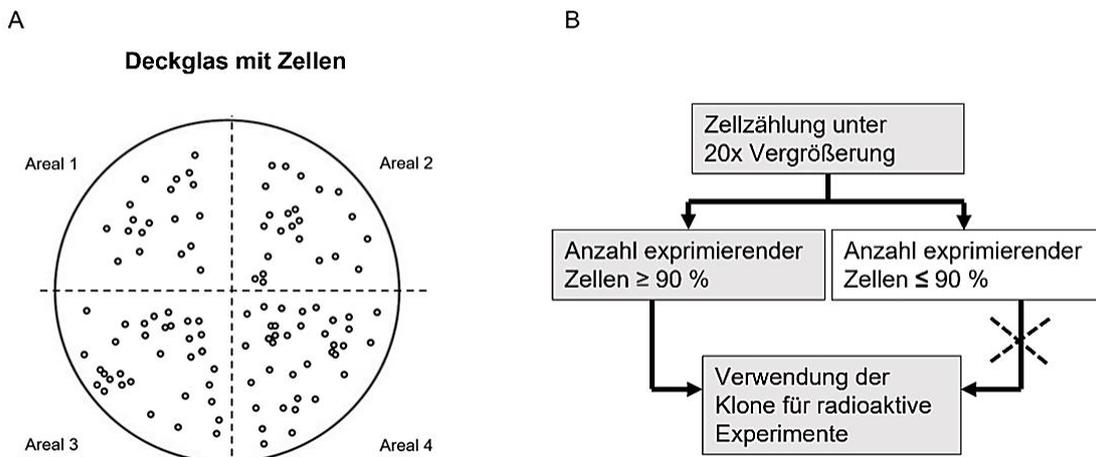


Abbildung 12: Schematische Darstellung zur Quantifizierung der Zellen. Die angefärbten Klone werden mikroskopiert und ausgezählt (A). Die Klone werden unter Verwendung von einem 20x-Objektiv in eine gedachte horizontale und vertikale Linie unterteilt, sowie anschließend ausgezählt (A). Klone, die eine Expression von $\geq 90\%$ zeigen, werden für weitere Experimente ausgewählt (B). Klone mit einer Expression von $\leq 90\%$ werden exkludiert.

Es wird ein Schwellenwert von ca. $\geq 90\%$ festgelegt, um zu gewährleisten, dass nur die Klone für weitere radioaktive Experimente verwendet werden, welche eine signifikante Expression der jeweiligen Kandidatengene zeigen. Ein ca. $\geq 90\%$ Grenzwert verbessert die Vergleichbarkeit der Klone untereinander und gewährleistet, dass die jeweiligen Aufnahme-Assay unter optimalen Bedingungen durchgeführt werden können. Anschließend wird aus jedem Areal die Zellzahl der überexprimierenden Zellen eines jeden Klons bestimmt (Abb. 13).

Klon und Kandidatengen	Standardabweichung [%]	Mittelwert [%]
Abb. A		
<i>SLC29A2/ENT2</i> _Klon 1	4 %	89 %
<i>SLC29A2/ENT2</i> _Klon 2	3 %	91 %
<i>SLC29A2/ENT2</i> _Klon 3	1 %	91 %
Abb. B		
<i>SLC22A9/OAT7</i> _Klon 1	1 %	94 %
<i>SLC22A9/OAT7</i> _Klon 2	1 %	97 %
<i>SLC22A9/OAT7</i> _Klon 3	2 %	94 %
Abb. C		
<i>ABCD1/ALDP</i> _Klon 1	1 %	99 %
<i>ABCD1/ALDP</i> _Klon 2	4 %	94 %
<i>ABCD1/ALDP</i> _Klon 3	4 %	92 %

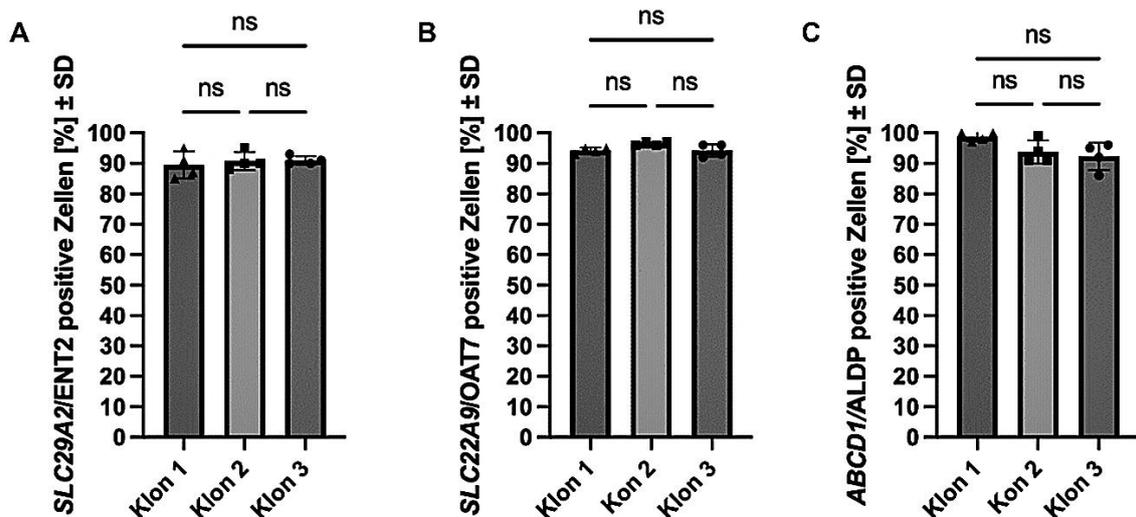


Abbildung 13: Repräsentative Darstellung von Überexpressionsklonen der jeweiligen Kandidatengene *SLC29A2/ENT2* (A), *SLC22A9/OAT7* (B) und *ABCD1/ALDP* (C). Die Analyse der Transportprotein-Expression in *SLC29A2/ENT2*-Überexpressionsklonen zeigt, dass alle ausgewählten Klone homogen sind (A). 89 % - 91 % der Zellen der jeweiligen Zellklone exprimieren *SLC29A2/ENT2* (A). Die Standardabweichung innerhalb der jeweiligen Klone umfasst zwischen 1 % - 4 % (A). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Klonen (A). Die Analyse der Transportprotein-Expression in *SLC22A9/OAT7*-Überexpressionsklonen zeigt, dass alle ausgewählten Klone ebenfalls homogen sind (B). 94 % - 97 % der Zellen der jeweiligen Zellklone exprimieren *SLC22A9/OAT7* (B). Die Standardabweichung innerhalb der jeweiligen Klone umfasst zwischen 1 % - 2 % (B). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Klonen (B). Die Analyse der Transportprotein-Expression in *ABCD1/ALDP*-Überexpressionsklonen zeigt, dass alle ausgewählten Klone homogen sind (B). 92 % - 99

% der Zellen der jeweiligen Zellklone exprimieren *ABCD1/ALDP* (C). Die Standardabweichung innerhalb der jeweiligen Klone umfasst zwischen 1 % - 4 % (C). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Klonen (C). Statistik: ungepaarte-parametrische-one-way-ANOVA unter Annahme einer Gauß-Verteilung ns $p > 0,05$. Folgende Abkürzungen werden verwendet: SD; Standardabweichung, ns; nicht signifikant.

Die hier dargestellten Klone wiesen alle eine Expression von ca. ≥ 90 % auf. Die Variabilität wird hierdurch reduziert und eine Reproduzierbarkeit sowie Vergleichbarkeit der Ergebnisse ermöglicht. Zudem zeigen alle Klone eine konsistent hohe Expression, wodurch weitere Experimente zuverlässige und valide Ergebnisse gewährleisten.

3.1.3 Detektion von *SLC29A2/ENT2*, *SLC22A9/OAT7* und *ABCD1/ALDP* im Western-Blot

Des Weiteren wird ein Western-Blot (WB) verwendet, um das Vorhandensein des Proteins zu validieren sowie nachzuweisen. Der WB dient der Detektion der Proteingröße der jeweiligen Transportproteine, wohingegen die quantitative Bestimmung mittels Fluoreszenzfärbung erfolgt.

Untransfizierte MDCK1-Zellen fungieren als Negativkontrolle. Alle Transportproteine werden mittels eines α -myc-9B11 Antikörpers detektiert. *SLC29A2/ENT2* und *SLC22A9/OAT7* wandern gemäß Literatur mit einem Molekulargewicht von 60 kDa durch das Polyacrylamidgel, während das Molekulargewicht von *ABCD1/ALDP* bei 80 kDa liegt (Abb. 14).

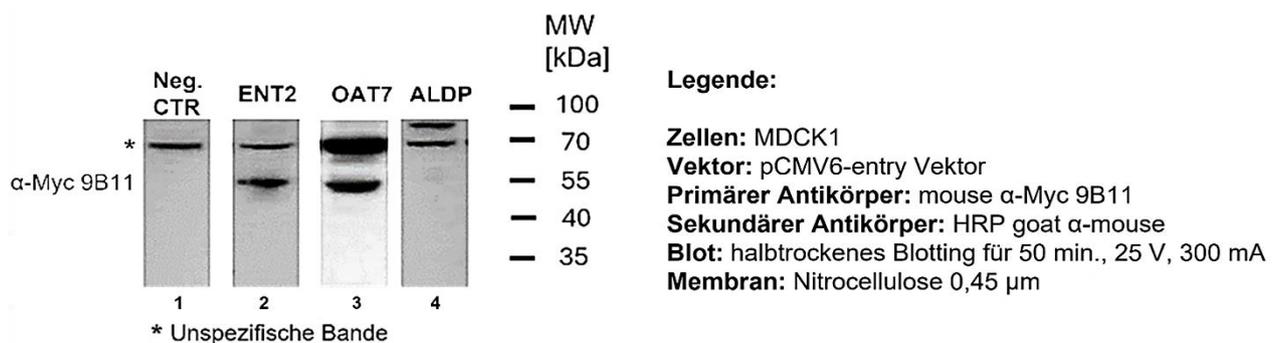


Abbildung 14: Repräsentative Darstellung der Proteindetektion von *SLC29A2/ENT2*, *SLC22A9/OAT7* und *ABCD1/ALDP*. *SLC29A2/ENT2* und *SLC22A9/OAT7* wandern mit einem Molekulargewicht von 60 kDa durch das Gel, wohingegen bei *ABCD1/ALDP* eine

Bande bei 80 kDa ersichtlich ist. Untransfizierte MDCK1-Zellen fungieren als Negativkontrolle. Zur Detektion der jeweiligen Proteine wird ein primärer α -Myc-9B11 Antikörper, sowie ein sekundärer HRP- α -Maus Antikörper, verwendet. Folgende Abkürzungen werden verwendet: MW; Molekulargewicht.

Aus dem Western-Blot geht hervor, dass die TRIAC-Kandidatengene *SLC29A2/ENT2*, *SLC22A9/OAT7* und *ABCD1/ALDP* erfolgreich detektiert werden können. *SLC29A2/ENT2* und *SLC22A9/OAT7* haben ein Molekulargewicht von 60 kDa, während *ABCD1/ALDP* eine Bande bei 80 kDa zeigt. Die Ergebnisse bestätigten, dass die zuvor stabil transfizierten MDCK1-Zellen die jeweiligen Zielproteine exprimieren. Somit können die Überexpressionsklone für nachfolgende Untersuchungen verwendet werden, um zuverlässige und robuste Ergebnisse zu erhalten.

3.1.4 *SLC29A2/ENT2* und *SLC22A9/OAT7* werden an der Plasmamembran von MDCK1-Zellen exprimiert

Des Weiteren erfolgt eine Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischen Antikörpern, durch welche die Lokalisierung und Charakterisierung der Transportproteine innerhalb der Zelle möglich ist. Ziel ist die Lokalisation des Proteins an der Plasmamembran und die Eingrenzung der potenziellen TRIAC-Kandidatengene. Zur Detektion des jeweiligen Transportproteins wird ein monoklonaler Maus α -Myc-9B11 Antikörper verwendet. Zur Immunfärbung der Plasmamembran wird ein α -E-Cadherin Decma-1 Antikörper verwendet, wodurch das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin detektiert werden kann. PDI hingegen ist ein Enzym im endoplasmatischen Retikulum (ER), während LAMP1 als Membranprotein in den Lysosomen der Zellen vorkommt. Mittels entsprechendem α -PDI, α -Lamp1 und α -Myc Antikörper werden die jeweiligen Transporter weiterhin auf potenzielle Co-Lokalisationen untersucht. Die Anfärbung des Nukleus erfolgt mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI). *SLC29A2/ENT2* ist ein spezifisches Transportprotein für Purine, Pyrimidine, Nukleoside, und Nukleobasen zu welchen Cytosin, Adenin, Uracil, Guanin und Thymin gehören (Ueda et al., 2015). Das Transportprotein kann durch den Inhibitor S-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosine (NBTI; NBMPR) inhibiert werden. Letzteres ist ein spezifischer Inhibitor von *SLC29A1/ENT1*. Durch die 46 % Sequenzhomologie zwischen *SLC29A2/ENT2* und *SLC29A1/ENT1* ist ebenso eine

Inhibition von *SLC29A2/ENT2* möglich. Der Equilibrative-Nukleosid-Transporter 2 (*SLC29A2/ENT2*) ist sowohl intrazellulär als auch in der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 15). Aus der Abbildung (Abb. 15) ist ersichtlich, dass nur ein Teil des immunreaktiven Proteins entlang der Plasmamembran exprimiert wird (Abb. 15) (Hasel et al., 2017; Naes et al., 2020a; Ueda et al., 2015). Aufgrund der hohen intrazellulären Detektion dienen α -PDI und α -Lamp1 Antikörper der weiteren Charakterisierung und Lokalisierung der Transporter. Aus der Abbildung (Abb. 15) geht eine Co-Lokalisierung des Transportproteins *SLC29A2/ENT2* mit PDI, sowie geringfügig Lamp1 hervor. PDI ist im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und als Protein disulfid Isomerase (PDI) an der Faltung von Proteinen beteiligt. *SLC29A2/ENT2* wird im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, jedoch möglicherweise weniger effizient gefaltet oder weniger effizient zur Plasmamembran transportiert (Abb. 15). Dennoch ist eine Expression von *SLC29A2/ENT2* an der Plasmamembran zu verzeichnen (Abb. 15). *SLC22A9/OAT7* ist ein Na^{2+} -unabhängiges multispezifisches Transportprotein, welches vorwiegend an der Plasmamembran lokalisiert ist. Der Transporter kann mit heterogenen anionischen Verbindungen, zu welchen nichtsteroidale entzündungshemmende Medikamente gehören, interagieren und kann durch Estron-3-Sulfat (ES; $K_M = 3,1 \mu\text{M}$) inhibiert werden (Yokoyama et al., 2008). Zudem weist *SLC22A9/OAT7* eine 69 % Ähnlichkeit zu *SLC22A19/OAT5* auf. *SLC22A9/OAT7* wird in multiplen Organen, jedoch vorwiegend in der Leber exprimiert (Riedmaier et al., 2015). Zudem besteht eine Expression im Gehirn, Gallenblase und Niere (Riedmaier et al., 2016). Das Transportprotein *SLC22A9/OAT7* ist überwiegend an der Plasmamembran überexprimierender MDCK1-Zellen lokalisiert (Abb. 16). Es besteht eine geringfügige intrazelluläre Co-Lokalisierung mit PDI und Lamp1. Dies deutet auf einen effizienten Transport von *SLC22A9/OAT7* zur Plasmamembran hin und weist auf die Stabilität des Proteins hin (Abb. 16). Der *ABCD1/ALDP*-Transporter ist Teil der ATP-bindenden (ABC) Familie, welche für primär aktive und ATP-abhängige Transporter kodiert, wohingegen die SLC-Familie zu den Schilddrüsenhormontransportern gehört und ATP-unabhängig ist. Das Kandidatengen *ABCD1/ALDP* ist hauptsächlich in den Peroxisomen lokalisiert. Es besteht eine Co-Lokalisierung mit Lamp1 (Abb. 17). *ABCD1/ALDP* wird im Zytoplasma synthetisiert und durch das Peroxin-19 Protein (Pex19p) erkannt, welches den Transport von *ABCD1/ALDP* zum Peroxisom ermöglicht. Am Peroxisom bindet Pex19p an das

Peroxin-3 Protein (Pex3p), wodurch die Integration von *ABCD1/ALDP* in die Peroxisomenmembran ermöglicht wird.

Aus der Fluoreszenzfärbung ist ersichtlich, dass insbesondere *SLC29A2/ENT2*, sowie vorwiegend *SLC22A9/OAT7* in der Plasmamembran detektierbar sind (Becker & Güth-Steffens et al., 2024). Überdies ist eine intrazelluläre Detektion von *SLC29A2/ENT2* und *SLC22A9/OAT7* ersichtlich, da die Proteinbiosynthese der Transporter im ER stattfindet, mit nachfolgender Translokation zur Plasmamembran. Im Vergleich zu *SLC22A9/OAT7* wird *SLC29A2/ENT2* in dessen Translokation zur Zellmembran zurückgehalten.

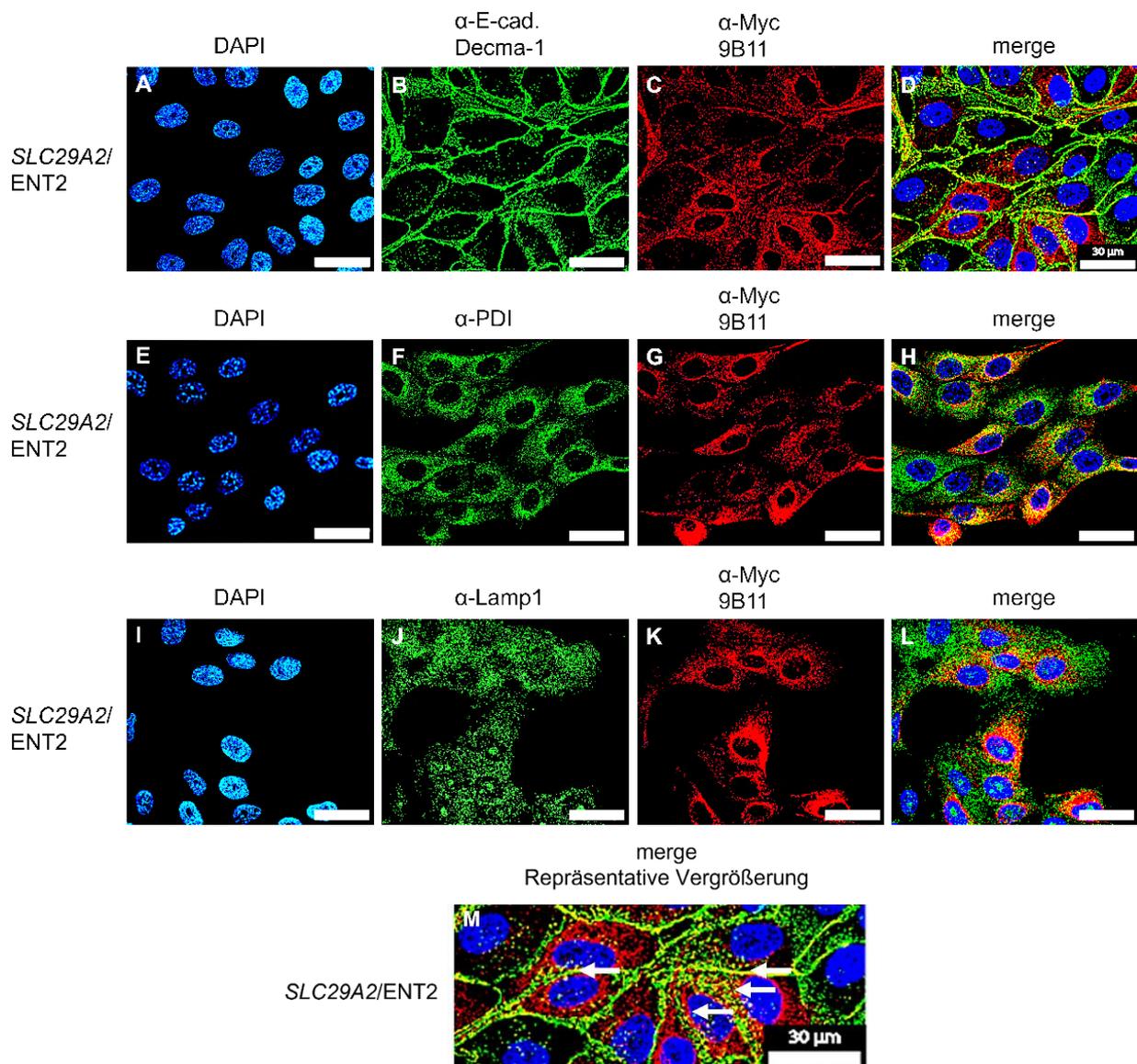


Abbildung 15: Lokalisierung und transgene Expression des *SLC29A2/ENT2*-Transportproteins in überexprimierenden MDCK1-Zellen. Die Anfärbung des Zellkerns erfolgt mit dem nukleären DAPI-Farbstoff (A, E, I), während *SLC29A2/ENT2* mit einem α -Myc-9B11 Antikörper (C, G, K) detektierbar ist. Die Plasmamembran ist mit einem α -E-Cadherin Antikörper (B) angefärbt. Lysosome werden mit α -Lamp1 (J) detektiert, während die Detektion von Bestandteilen des Endoplasmatischen-Retikulums mit α -PDI (F) erfolgt. Weiterhin werden die Fluoreszenzkanäle kombiniert und überlagert (gelb) dargestellt (D, H, L, M). Lamp1 zeigt eine geringfügige Co-Lokalisierung mit dem *SLC29A2/ENT2*-Transportprotein (L). Zudem ist eine Co-Lokalisierung mit PDI ersichtlich (H). Aus der Überlagerung der Kanäle (D, H, L) geht eine vorwiegend intrazelluläre Lokalisation des rekombinanten Proteins mit geringfügiger Expression an der Plasmamembran hervor (D, M). Die Co-Lokalisierung von E-Cadherin mit *SLC29A2/ENT2* ist zudem in der Vergrößerung ersichtlich (M). Folgende Abkürzungen werden verwendet: PDI; Protein disulfid Isomerase, Lamp1; Lysosomal assoziiertes Membranprotein 1, E-Cadherin; Epitheliales Cadherin, DAPI; 4',6-Diamidino-2-phenylindol. Maßstab: 30 μ m.

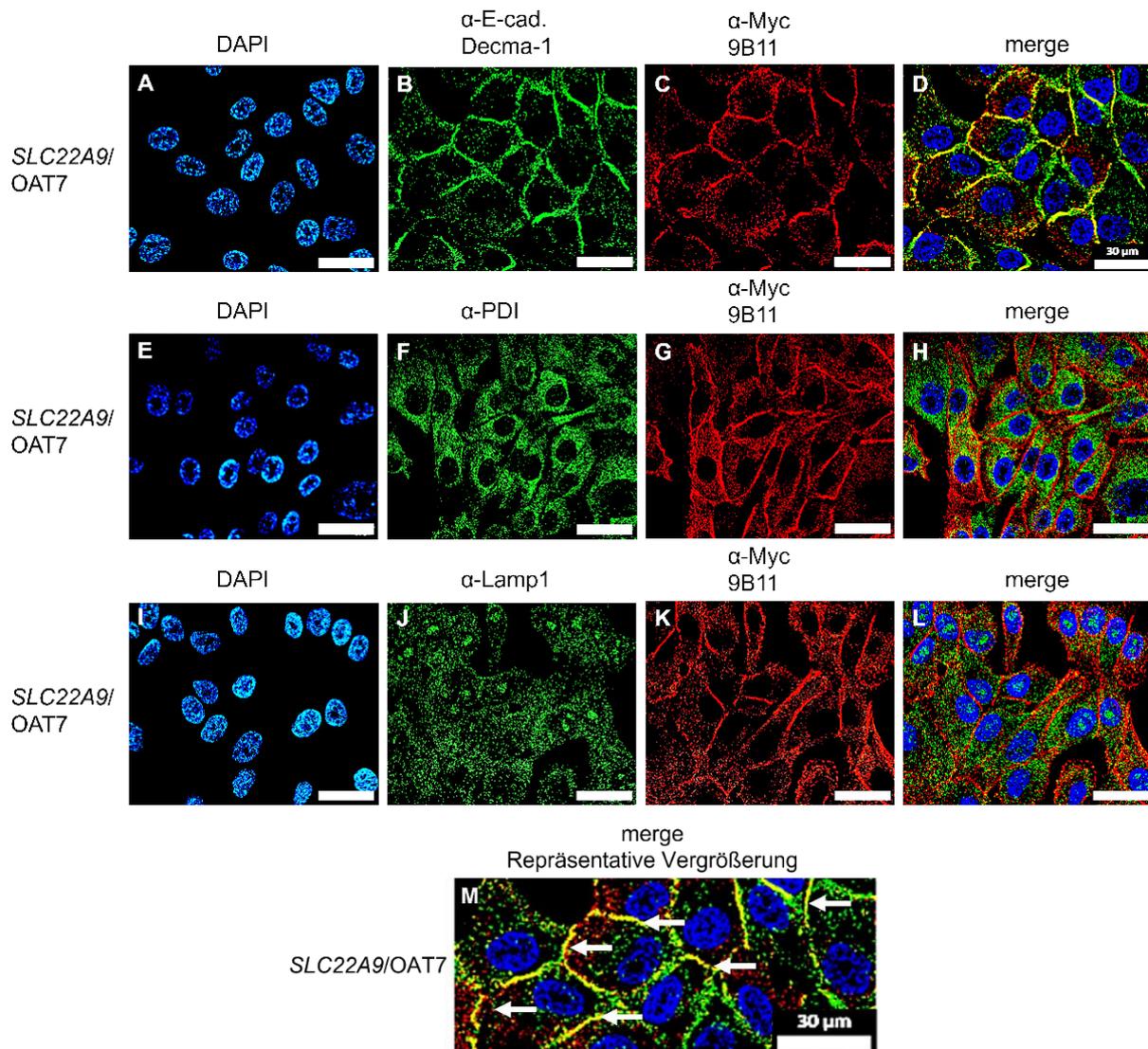


Abbildung 16: Lokalisierung und transgene Expression des *SLC22A9/OAT7*-Transportproteins in überexprimierenden MDCK1-Zellen. Die Anfärbung des Zellkerns erfolgt mit dem nukleären DAPI-Farbstoff (A, E, I), während *SLC22A9/OAT7* mit einem α -Myc-9B11 Antikörper (C, G, K) detektierbar ist. Die Plasmamembran ist mit einem α -E-Cadherin Antikörper (B) angefärbt. Lysosome werden mit α -Lamp1 detektiert (J), während die Detektion von Bestandteilen des Endoplasmatischen-Retikulums mit α -PDI erfolgt (F). Weiterhin werden die Fluoreszenzkanäle kombiniert und überlagert (gelb) dargestellt (D, H, L, M). Lamp1 zeigt eine geringfügige Co-Lokalisierung mit dem *SLC22A9/OAT7*-Transportprotein (L). Zudem ist eine geringfügige Co-Lokalisierung mit PDI ersichtlich (H). Die Überlagerung der Kanäle zeigt, dass *SLC22A9/OAT7* hauptsächlich in der Plasmamembran lokalisiert ist (D, M). Die Co-Lokalisierung von E-Cadherin mit *SLC22A9/OAT7* ist zudem in der Vergrößerung ersichtlich (M). Folgende Abkürzungen werden verwendet: PDI; Protein disulfid Isomerase, Lamp1; Lysosomal assoziiertes Membranprotein 1, E-Cadherin; Epitheliales Cadherin, DAPI; 4',6-Diamidino-2-phenylindol. Maßstab: 30 μ m.

ABCD1/ALDP zeigt eine überwiegend intrazelluläre Färbung, sowie Co-Lokalisierung mit Lamp1. Die hohe intrazelluläre Detektion von *ABCD1/ALDP* entspricht der Literatur, weshalb *ABCD1/ALDP* kein relevantes Transportprotein für den Import von TRIAC in die Zelle darstellen kann (Xiong et al., 2023).

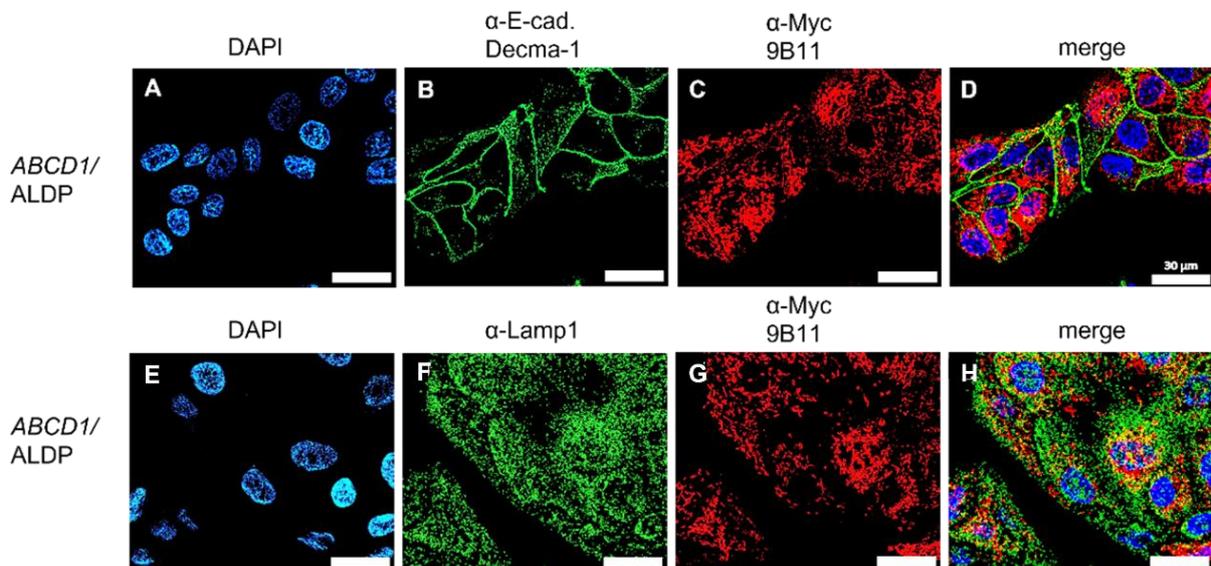


Abbildung 17: Lokalisierung und transgene Expression des *ABCD1/ALDP*-Transportproteins in überexprimierenden MDCK1-Zellen. Die Anfärbung des Zellkerns erfolgt mit dem nukleären DAPI-Farbstoff (A, E), während *ABCD1/ALDP* mit einem α -Myc-9B11 Antikörper (C, G) detektierbar ist. Die Plasmamembran ist mit einem α -E-Cadherin Antikörper angefärbt (B). Lysosome werden mit α -Lamp1 detektiert (F). Weiterhin werden die Fluoreszenzkanäle kombiniert und überlagert (gelb) dargestellt (D, H). E-Cadherin (D) und Lamp1 (H) zeigen eine geringe Co-Lokalisierung mit *ABCD1/ALDP*. Folgende

Abkürzungen werden verwendet: Lamp1; Lysosomal assoziiertes Membranprotein 1, E-Cadherin; Epitheliales Cadherin, DAPI; 4',6-Diamidino-2-phenylindol. Maßstab: 30 µm.

Aus der immunhistologischen Färbung geht eine unterschiedliche Expression der jeweiligen Kandidatengene an der Plasmamembran hervor. *SLC22A9/OAT7* zeigt vornehmlich eine Expression an der Plasmamembran, wohingegen *SLC29A2/ENT2* eine geringe Expression an der Plasmamembran aufweist. *ABCD1/ALDP* zeigt annähernd keine Expression an der Plasmamembran. Folglich werden *SLC29A2/ENT2* und *SLC22A9/OAT7* für nachfolgende Aufnahme-Assay verwendet.

3.1.5 *SLC29A2/ENT2* und *SLC22A9/OAT7* sind Transportproteine für ¹²⁵I-TRIAC

Zur Identifizierung der ¹²⁵I-TRIAC-Transportproteine wird ein zeitabhängiges ¹²⁵I-TRIAC Aufnahme-Assay mit anschließender Kompetition der Transportproteine durchgeführt. Letzteres dient der Validierung der Ergebnisse.

Hierbei ermöglicht der Aufnahme-Assay die direkte Messung des aufgenommenen radioaktiven Isotops zu verschiedenen Messzeitpunkten. Die Transportaktivität wird direkt ohne Interaktion weiterer Substrate gemessen und kann Informationen über die Transportkinetik, Transportgeschwindigkeit und Affinität geben. Die Transportkinetik ist hierbei die zeitliche Abhängigkeit der Transportaktivität. Bei einem Kompetitions-Assay besteht nur ein Messzeitpunkt zur Untersuchung dessen, ob ein weiteres Substrat ebenfalls am gleichen Transportprotein binden kann. Dieses kann sowohl markiert als auch unmarkiert sein. Gemessen wird, ob und wie stark die Aufnahme des Zielsubstrats durch die Bindung des konkurrierenden Substrats reduziert wird. Dies ermöglicht zudem die Validierung von Ergebnissen aus einem vorherigen Aufnahme-Assay.

In mehreren unabhängigen Experimenten werden zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten die jeweiligen Überexpressionsklone der Kandidatengene *SLC29A2/ENT2*, *SLC22A9/OAT7* und *ABCD1/ALDP* mit radioaktivem ¹²⁵I-TRIAC inkubiert. Die Aufnahme des radioaktiven ¹²⁵I-TRIACs wird hierbei mittels der emittierten Radioaktivität in einem Gammazähler zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen (Abb. 18). Die Kandidatengene *SLC29A2/ENT2* und *SLC22A9/OAT7* zeigen eine zeitabhängige ¹²⁵I-TRIAC-Aufnahme (Abb. 18). Aus der zeitabhängigen ¹²⁵I-TRIAC-Aufnahme geht hervor, dass beide

Transporter jodierte Moleküle transportieren können. Die hier vorgenommenen zeitabhängigen Aufnahme-Assay beinhalten Informationen zur Aufnahmegeschwindigkeit sowie indirekte Informationen zur Dynamik der Substratbindung. Zudem ergibt sich aus dem Kurvenverlauf des zeitabhängigen Aufnahme-Assay eine tendenziell ähnliche hyperbolische Kurve und somit eine potenziell ähnliche Affinität beider Transporter zu ^{125}I -TRIAC.

Im Weiteren soll mittels Nitrobenzyl-6-thioinosin (NBTI) eine Kompetition des *SLC29A2/ENT2*-Transporters erfolgen. S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosin (NBTI) gehört zur Familie der S6-substituierten 6-Thiopurin-Nukleoside, welche der Regulation von Nukleosid-Transportmechanismen dienlich sind. NBTI fungiert zudem als Inhibitor für einige ENT-Transporter. Zu letzteren gehören vorwiegend Adenosin-Transporter des zentralen Nervensystems. Estron-3-Sulfat gehört zu den sulfo-konjugierten Steroidformen und kann mittels Östrogensulfatase in biologisch aktives Östrogen umgewandelt werden. Östrogene sind für den menschlichen Körper essenziell und wirken an nukleären Rezeptoren. Zudem fungiert Estron-3-Sulfat (E3S) als Kompetitor des *SLC22A9/OAT7*-Transporters. *SLC22A9/OAT7* ist als ein Transportprotein für multiple Medikamente.

Aus der Co-Inkubation von ^{125}I -TRIAC mit Nitrobenzyl-6-thioinosin (NBTI) geht eine Inhibition der ^{125}I -TRIAC-Aufnahme durch Kompetition des *SLC29A2/ENT2*-Transporters hervor (Abb. 19). Die Co-Inkubation von ^{125}I -TRIAC mit E3S führt ebenfalls zu einer Inhibition der ^{125}I -TRIAC-Aufnahme durch Kompetition des *SLC22A9/OAT7*-Transporters, wodurch beide Kandidatengene als ^{125}I -TRIAC-Transporter identifiziert und bestätigt werden können (Abb. 19). Das Endpunkt-Assay bezieht sich auf nur einen gemessenen Zeitpunkt (Abb. 19).

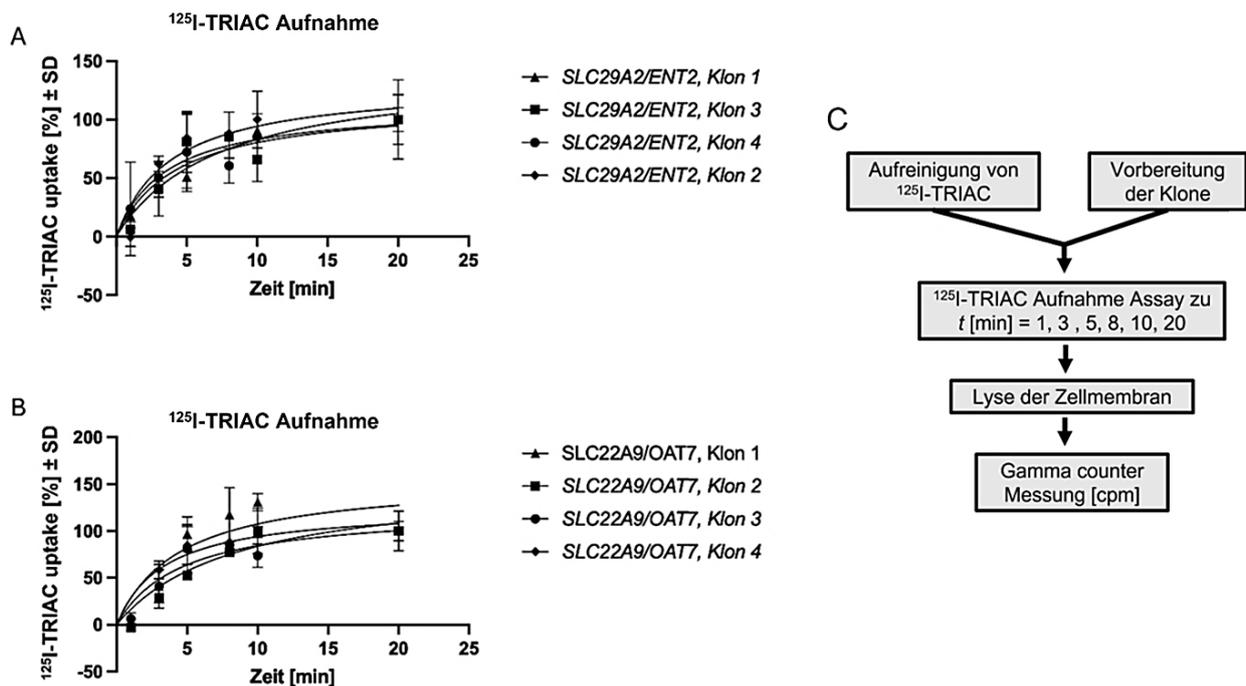


Abbildung 18: Transportaktivität und Zeitverlaufsanalyse von ¹²⁵I-TRIAC in *SLC29A2/ENT2*- (A) und *SLC22A9/OAT7*-Überexpressionsklonen (B). *SLC29A2/ENT2*- ($R^2 = 0,4654 - 0,8238$) Überexpressionsklone (A) zeigen eine zeitabhängige ¹²⁵I-TRIAC-Aufnahme ($n = 4$). *SLC22A9/OAT7*- ($R^2 = 0,6209 - 0,8901$) Überexpressionsklone (B) zeigen ebenfalls eine zeitabhängige ¹²⁵I-TRIAC-Aufnahme ($n = 4$). Die Bestimmung der Messzeitpunkte erfolgt jeweils zu t [min] = 1, 3, 5, 8, 10, 20 (C). Anschließend werden die Zellen lysiert und die ¹²⁵I-TRIAC-Aufnahme mittels Gammazähler gemessen (C). Die Sättigung ist jeweils nach 20 min erreicht (A, B). Untransfizierte MDCK1-Zellen fungieren als Negativkontrolle und werden als Hintergrund subtrahiert. Alle Klone werden auf den 20 min Messzeitpunkt normalisiert. Letzteres wird als 100 % definiert, wodurch die Kombination voneinander unabhängiger Experimente möglich ist. Folgende Abkürzungen werden verwendet: TRIAC; 3,5,3'-Trijodthyoessigsäure, SD; Standardabweichung. In Kooperation mit N. Sonntag ($n=2$) und M. Güth-Steffens ($n=2$).

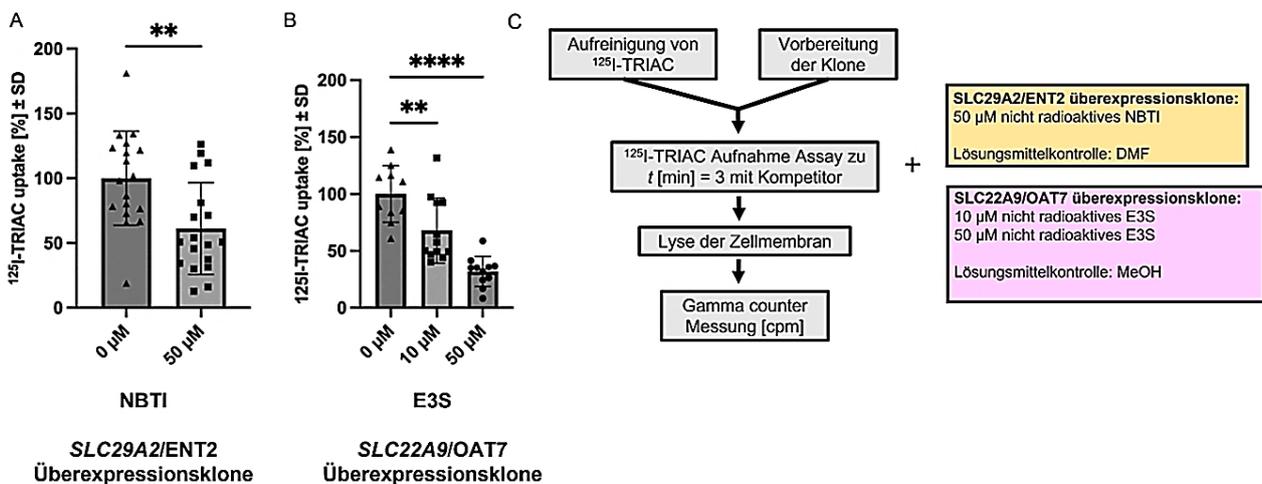


Abbildung 19: Inhibition der ^{125}I -TRIAc-Aufnahme mittels Co-Inkubation der jeweiligen Kompetitoren nach 3 Minuten. Aus der Abbildung (A) geht eine signifikante Inhibition der ^{125}I -TRIAc-Aufnahme bei Zugabe von $50\ \mu\text{M}$ NBTI in *SLC29A2/ENT2*-Überexpressionsklonen hervor ($n=6$). NBTI kompetitiert die ^{125}I -TRIAc-Aufnahme von *SLC29A2/ENT2*-Transportproteinen. Aus der Abbildung (B) geht eine konzentrationsabhängige Inhibition der ^{125}I -TRIAc-Aufnahme bei Co-Inkubation mit $10\ \mu\text{M}$ und $50\ \mu\text{M}$ E3S hervor ($n=6$). E3S kompetitiert die ^{125}I -TRIAc-Aufnahme von *SLC22A9/OAT7*-Transportproteinen. Hierbei wird der Messzeitpunkt bei $t\ [\text{min}] = 3$ festgelegt (C). Untransfizierte MDCK1-Zellen, welche nur mit dem jeweiligen Lösungsmittel behandelt werden, fungieren als Lösungsmittelkontrolle (C). *SLC29A2/ENT2*-Überexpressionsklone werden mit ^{125}I -TRIAc, sowie $50\ \mu\text{M}$ NBTI behandelt, während DMF als Lösungsmittel fungiert (C). *SLC22A9/OAT7*-Überexpressionsklone werden mit ^{125}I -TRIAc, sowie $10\ \mu\text{M}$ und $50\ \mu\text{M}$ E3S behandelt, während MeOH als Lösungsmittel fungiert (C). Anschließend werden die Zellen lysiert und die ^{125}I -TRIAc-Aufnahme mittels Gammazähler gemessen (C). Alle Werte werden auf die mit der Lösungsmittelkontrolle Co-inkubierten Zellen normalisiert. Statistik: Ungepaarter-nicht-parametrischer-Mann-Whitney-Test für *SLC29A2/ENT2* ns $p>0,05$, $**p<0,01$. Statistik: ungepaarte-parametrische-one-way-ANOVA unter Annahme einer Gauß-Verteilung für *SLC22A9/OAT7* ns $p>0,05$, $**p<0,01$, $****p<0,0001$. Folgende Abkürzungen werden verwendet: NBTI; Nitrobenzyl-6-thioinosin, E3S; Estron-3-Sulfat, DMF; Dimethylformamid, MeOH; Methanol, SD; Standardabweichung.

Aus dem Aufnahme-Assay geht eine zeitabhängige Aufnahme von ^{125}I -TRIAc hervor. Die Ergebnisse zeigen, dass es sich bei den getesteten Kandidatengen *SLC29A2/ENT2* und *SLC22A9/OAT7* um ^{125}I -TRIAc-Transportproteine handelt. Dies kann durch konzentrationsabhängige Competition mit dem jeweiligen kompetitiven Inhibitor des Transportproteins validiert werden. Die Aufnahme von ^{125}I -TRIAc ist nach Zugabe des Kompetitors signifikant reduziert und bestätigt, dass die ^{125}I -TRIAc-Aufnahme auf die Aktivität von *SLC29A2/ENT2* und *SLC22A9/OAT7* zurückzuführen ist.

In diesem Kontext stellen der IC₅₀- und EC₅₀-Wert weitere wichtige Werte zur Charakterisierung der Transportproteine dar. In der Pharmakologie ist der IC₅₀-Wert ein Maß für die Potenz von Inhibitoren und bezieht sich auf unterschiedliche Aspekte der Wirkung von Stoffen. Der IC₅₀-Wert gibt an, ab wann die Konzentration des Inhibitors hinreichend ist, um eine 50 % Inhibition zu erreichen, wodurch die Wirksamkeit des Inhibitors analysiert werden kann. Je niedriger der IC₅₀-Wert ist, desto potenter ist der Inhibitor. Aus der Competition der ^{125}I -TRIAc-Aufnahme mit NBTI geht hervor, dass mit $50\ \mu\text{M}$ des Kompetitors eine 40 % Inhibition des *SLC29A2/ENT2*-Transporters erreicht werden kann. Bei dem *SLC22A9/OAT7*-Transportprotein kann mit einer Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ des Kompetitors, eine 40 % Inhibition nach 3 min erreicht werden. Dies deutet

darauf hin, dass es sich bei E3S um einen kompetenten Kompetitor gegenüber des *SLC22A9/OAT7*-Transporters handeln könnte. NBTI ist ein weniger potenter kompetitiver Inhibitor für *SLC29A2/ENT2*.

3.1.6 Das ¹²⁵I-TRIAC-Aufnahme-Assay kann durch Erhöhung der Substratkonzentration in Überexpressionsklonen optimiert werden

Des Weiteren erfolgt eine Untersuchung hinsichtlich dessen, ob der Aufnahme-Assay durch Zugabe und konzentrationsabhängiger Co-Inkubation mit nicht-radioaktiven TRIAC so optimiert werden kann, dass die Transportaktivität zunimmt und eine verstärkte Zeitverlaufskurve ersichtlich wird. Ziel ist es, die Transportaktivität der jeweiligen TRIAC-Kandidatengene zu erhöhen und weiter zu charakterisieren.

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration wird nach je 3 min eine Endpunkt-Bestimmung vorgenommen, bei welcher ¹²⁵I-TRIAC mit jeweils 10 µM, 20 µM, 50 µM und 100 µM nicht-radioaktivem TRIAC Co-inkubiert wird (Abb. 20). Hierdurch erfolgt eine Annäherung an den K_M -Wert. Der K_M -Wert gibt dabei die Substratkonzentration an, bei welcher die Transporter halbmaximal aktiv sind, während die Bestimmung von V_{max} zuzügliche Informationen zur Effizienz der Transportkapazität liefert. Untransfizierte MDCK1-Zellen werden nur mit dem Lösungsmittel behandelt und fungieren demnach als Lösungsmittelkontrolle.

Aus dem konzentrationsabhängigen Aufnahme-Assay ergibt sich für die Transportproteine *SLC29A2/ENT2* und *SLC22A9/OAT7* eine Sättigung der Transportaktivität bei 10 - 20 µM nicht-radioaktivem TRIAC. Aus dem zeitabhängigen Aufnahme-Assay und unter Zugabe von 10 µM nicht-radioaktiven TRIAC ist eine optimierte Zeitverlaufskurve und gesteigerte Transportaktivität ersichtlich (Abb. 21). Die erhöhte Substratverfügbarkeit führt zu einer erhöhten Bindungswahrscheinlichkeit der Substrate an die Transportproteine, wodurch die Transportrate und Transportaktivität gesteigert werden kann. Zudem sind mehr Transporter mit Substrat gesättigt. Bei einem Substratüberangebot kommt es zu einer Kompetition um die Bindestelle und folglich einer reduzierten ¹²⁵I-TRIAC-Aufnahme. Mittels 10 µM nicht-radioaktivem TRIAC kann folglich die Transportaktivität gesteigert und optimiert werden.

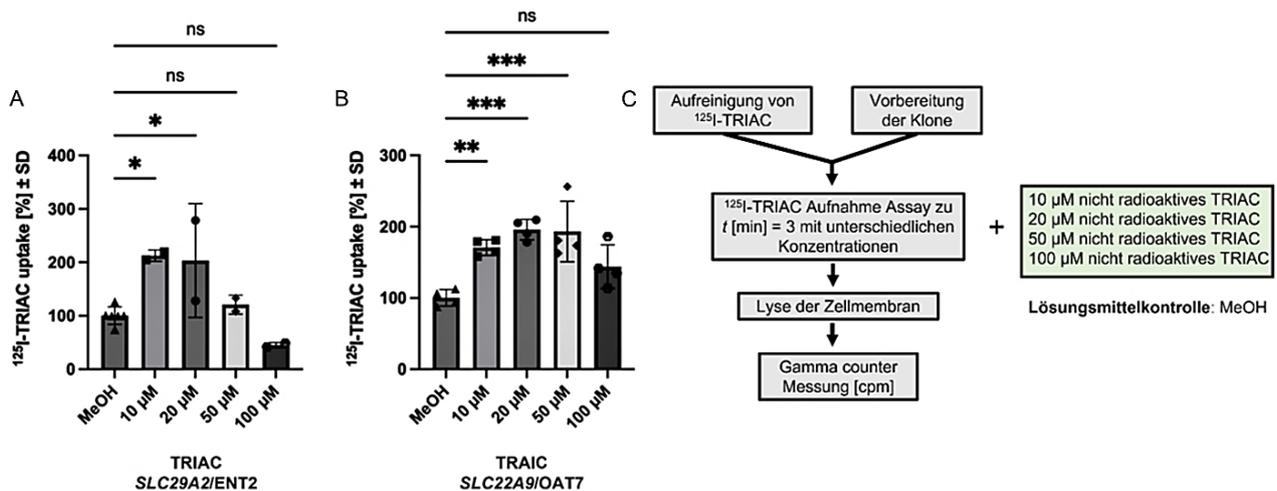


Abbildung 20: ^{125}I -TRIAC-Aufnahme bei konzentrationsabhängiger Co-Inkubation mit 10 μM , 20 μM , 50 μM und 100 μM nicht-radioaktivem TRIAC nach 3 min in *SLC29A2/ENT2*- und *SLC29A2/ENT2*-Überexpressionsklonen. Aus der Abbildung geht eine optimierte ^{125}I -TRIAC-Aufnahme bei Zugabe von 10 μM und 20 μM nicht-radioaktiven TRIAC hervor (A). Die Erhöhung der Substratkonzentration auf 50 μM – 100 μM nicht-radioaktivem TRIAC resultiert in einer konzentrationsabhängigen Konkurrenz der ^{125}I -TRIAC-Aufnahme (A). Aus Abbildung geht eine verbesserte ^{125}I -TRIAC-Aufnahme bei Zugabe von 10 μM , 20 μM und 50 μM nicht-radioaktiven TRIAC in *SLC22A9/OAT7* exprimierenden Klonen hervor (B). Die Erhöhung der Substratkonzentration auf 100 μM nicht-radioaktivem TRIAC resultiert in einer konzentrationsabhängigen Konkurrenz der ^{125}I -TRIAC-Aufnahme infolge einer Übersättigung des *SLC22A9/OAT7*-Transportproteins (B). Als Lösungsmittelkontrolle fungieren untransfizierte MDCK1-Zellen, welche nur mit dem Vehicle/Lösungsmittel behandelt werden. Die Endpunkt-Bestimmung erfolgt für *SLC29A2/ENT2*- und *SLC22A9/OAT7*-Überexpressionsklonen bei t [min] = 3, während MeOH als Lösungsmittel fungiert (C). Anschließend werden die Zellen lysiert und im Gammazähler gemessen (C). Alle Werte werden dann auf die Lösungsmittelkontrolle normalisiert. Statistik: ungepaarte-parametrische-one-way-ANOVA unter Annahme einer Gauß-Verteilung für ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,01$. Folgende Abkürzungen werden verwendet: TRIAC; 3,5,3'-Trijodthyroessigsäure, SD; Standardabweichung.

Um zu untersuchen, welche Konzentration notwendig ist, um die Transportaktivität von ^{125}I -TRIAC durch *SLC29A2/ENT2*- und *SLC22A9/OAT7*-Transporter zu optimieren und zu steigern, werden in der hier vorliegenden Arbeit weitere Endpunkt-Assay vorgenommen. Hierbei weisen sowohl *SLC29A2/ENT2* als auch *SLC22A9/OAT7* bei Zugabe von nicht-radioaktivem TRIAC eine ähnliche Substratkapazität auf. Die erhöhte Substratverfügbarkeit führt zu einer erhöhten Bindungswahrscheinlichkeit der Substrate an die Transportproteine, wodurch die Transportrate und Transportaktivität gesteigert werden kann. Basierend auf den Ergebnissen aus dem Endpunkt-Assay wird für weitere zeitabhängige ^{125}I -TRIAC Aufnahme-Assay eine Konzentration von zuzüglich 10 μM

nicht-radioaktives TRIAC verwendet. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass die Transportaktivität, sowie Transportrate von *SLC29A2/ENT2*- und *SLC22A9/OAT7*-Transporter bereits bei Zugabe von 10 μM nicht-radioaktivem TRIAC optimiert werden kann (Abb. 21).

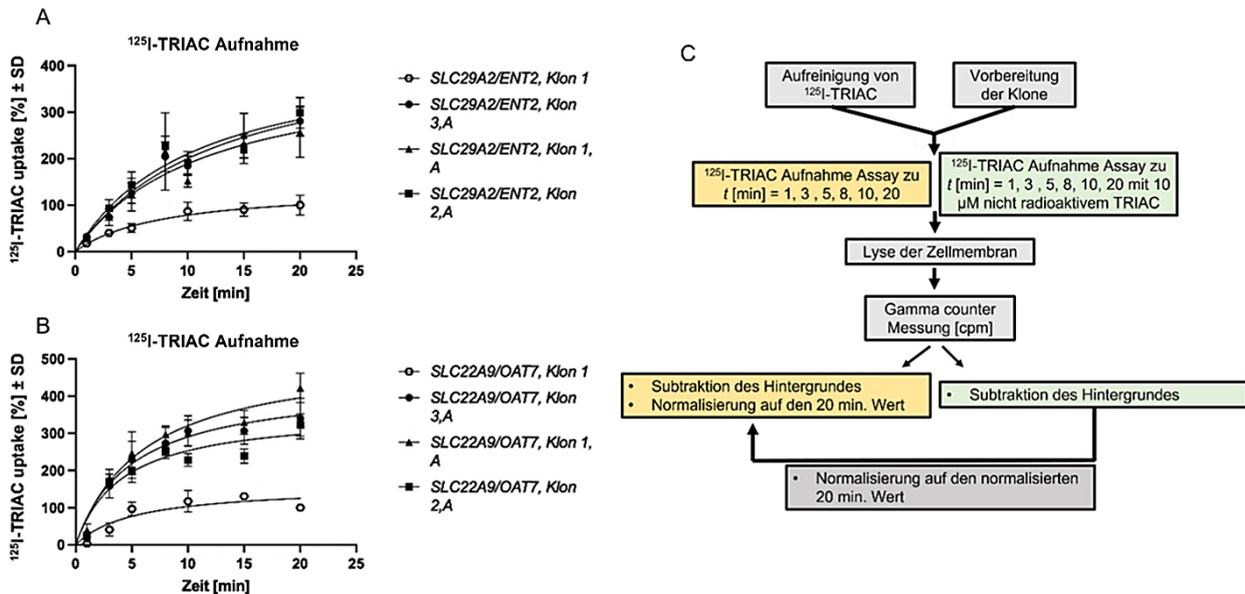


Abbildung 21: Transportaktivität und Zeitverlaufsanalyse von ¹²⁵I-TRIAC bei Co-Inkubation mit 10 μM nicht-radioaktiven TRIAC ($n = 4$). *SLC29A2/ENT2*- ($R^2 = 0,6983 - 0,8735$) Überexpressionsklone (A) zeigen eine zeitabhängige ¹²⁵I-TRIAC-Aufnahme bei Co-Inkubation mit 10 μM nicht-radioaktivem TRIAC (Klon 1A, 2A, 2A). *SLC29A2/ENT2* Klon 1 (Referenzklon) wird mit ¹²⁵I-TRIAC und ohne Zugabe von nicht-radioaktivem TRIAC behandelt (A). Aus der Abbildung geht eine erhöhte Transportaktivität hervor, wenn *SLC29A2/ENT2*-Überexpressionsklone zuzüglich mit 10 μM nicht-radioaktivem TRIAC behandelt werden (A). *SLC22A9/OAT7*- ($R^2 = 0,7712 - 0,8467$) Überexpressionsklone (B) zeigen eine zeitabhängige ¹²⁵I-TRIAC-Aufnahme bei Co-Inkubation mit 10 μM nicht-radioaktivem TRIAC (Klon 1A, 2A, 2A). *SLC22A9/OAT7* Klon 1 (Referenzklon) wird mit ¹²⁵I-TRIAC und ohne Zugabe von nicht-radioaktivem TRIAC behandelt (B). Aus der Abbildung geht eine erhöhte Transportaktivität hervor, wenn *SLC29A2/ENT2*-Überexpressionsklone zuzüglich mit 10 μM nicht-radioaktivem TRIAC behandelt werden (B). Aus der Abbildung ist somit ersichtlich, dass die Transportaktivität unter Zugabe von 10 μM zusätzlichem nicht-radioaktivem TRIAC gesteigert werden kann (A, B). Hierbei wird der Messzeitpunkt bei $t [\text{min}] = 1, 3, 5, 8, 10$ und 20 festgelegt (C). Anschließend werden die Zellen lysiert und die ¹²⁵I-TRIAC-Aufnahme mittels Gammazähler gemessen (C). Der Referenzklon wird auf den 20 min Messzeitpunkt normalisiert und als 100 % definiert (C). Die mit 10 μM nicht-radioaktivem TRIAC behandelten Klone werden anschließend auf die Referenzklone *SLC29A2/ENT2*, Klon 1 oder *SLC22A9/OAT7*, Klon 1) normalisiert (C). Untransfizierte MDCK1-Zellen fungieren als Negativkontrolle und werden als Hintergrund subtrahiert (C). Folgende Abkürzungen werden verwendet: TRIAC; 3,5,3'-Trijodthyroessigsäure, SD; Standardabweichung.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Zugabe von 10 μM nicht-radioaktiven TRIAC zu einer signifikanten Steigerung von ^{125}I -TRIAC führt. Die Transporter nehmen das 2-3-fache an ^{125}I -TRIAC auf, wenn diese durch zusätzliches nicht-radioaktives TRIAC stimuliert werden. Die erhöhte Substratverfügbarkeit führt zu einer erhöhten Bindungswahrscheinlichkeit der Substrate an die Transportproteine, wodurch die Transportrate und Transportaktivität gesteigert werden kann.

3.1.7 *SLC22A9/OAT7* exprimierende Zellen zeigen eine Reduktion der ^{125}I -TRIAC-Aufnahme bei Co-Inkubation mit nicht-radioaktivem Sobetirome und DITPA

Des Weiteren soll untersucht werden, ob es sich bei den *SLC29A2/ENT2*- und *SLC22A9/OAT7*-Transportern auch um potenzielle Transporter handelt, welche die Schilddrüsenhormone Tr3 und T3 transportieren (Abb. 22). Hierzu wird nach 15 min eine Endpunkt-Bestimmung mit ^{125}I -Tr3 und ^{125}I -T3 vorgenommen. Das Ziel besteht darin, *SLC22A9/OAT7* als potenzielles Transportprotein von weiteren Schilddrüsenhormonen, Derivate und Analoga zu identifizieren und charakterisieren. Aus den dargestellten Ergebnissen ist ersichtlich, dass beide Transportproteine ^{125}I -TRIAC, jedoch nicht ^{125}I -T3 und ^{125}I -rT3 transportieren können (Abb. 22).

Aufgrund der vielfältigen Substrattransporteigenschaften von *SLC22A9/OAT7* wird im Weiteren ein Endpunkt-Assay mit ^{125}I -TRIAC und nicht-radioaktivem Sobetirome durchgeführt. Hierbei ist nach 3-minütiger Inkubation eine signifikante Reduktion der ^{125}I -TRIAC-Aufnahme ersichtlich, während die Co-Inkubation mit DITPA ebenfalls eine geringfügige, jedoch nicht signifikante Reduktion hinsichtlich der ^{125}I -TRIAC-Aufnahme in *SLC22A9/OAT7*-Überexpressionsklonen zeigt (Abb. 23).

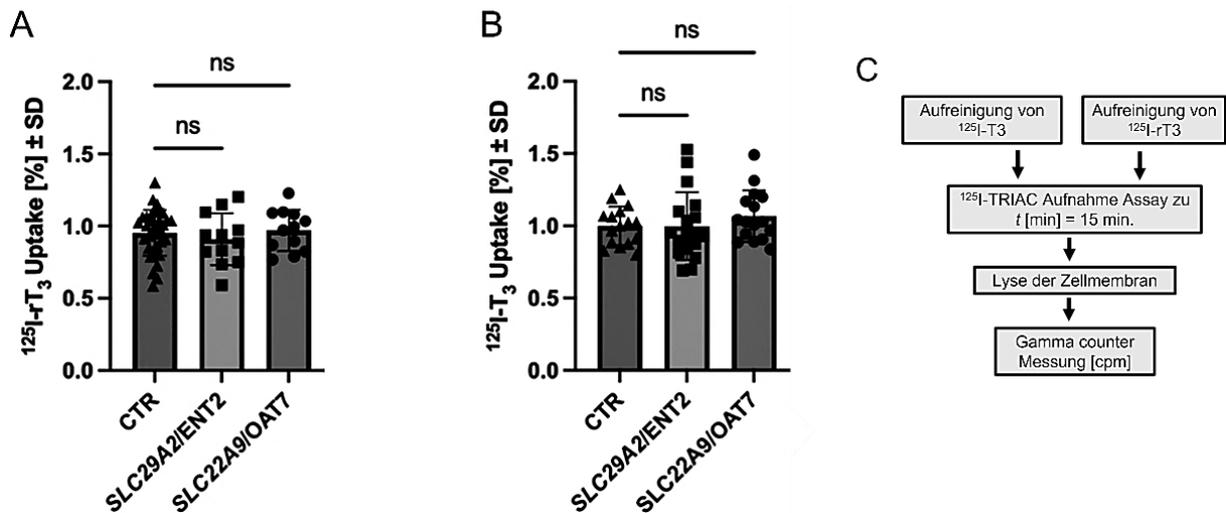


Abbildung 22: Transportfähigkeit von $^{125}\text{I-rT}_3$ und $^{125}\text{I-T}_3$ in *SLC29A2/ENT2*- und *SLC22A9/OAT7*-Überexpressionsklonen nach 15 Minuten. Aus der Abbildung geht die $^{125}\text{I-rT}_3$ -Aufnahme in *SLC29A2/ENT2*- und *SLC22A9/OAT7*-Überexpressionsklonen hervor (A). Untransfizierte MDCK1-Zellen fungieren als Negativkontrolle. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen *SLC29A2/ENT2*- und *SLC22A9/OAT7*-Überexpressionsklonen, sowie der Negativkontrolle (A). *SLC29A2/ENT2*- und *SLC22A9/OAT7*-Transportproteine sind keine $^{125}\text{I-rT}_3$ -Transporter (A). Aus Abbildung geht die $^{125}\text{I-T}_3$ -Aufnahme in *SLC29A2/ENT2*- und *SLC22A9/OAT7*-Überexpressionsklonen hervor (B). Untransfizierte MDCK1-Zellen fungieren als Negativkontrolle (A, B). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen *SLC29A2/ENT2*- und *SLC22A9/OAT7*-Überexpressionsklonen, sowie der Negativkontrolle (A, B). *SLC29A2/ENT2*- und *SLC22A9/OAT7*-Transportproteine sind keine $^{125}\text{I-T}_3$ -Transporter (B). Die Endpunkt-Bestimmung erfolgt für *SLC29A2/ENT2*- und *SLC22A9/OAT7*-Überexpressionsklonen bei t [min] = 3 (C). Anschließend werden die Zellen lysiert und im Gammazähler gemessen (C). Statistik: ungepaarte-parametrische one-way-ANOVA unter Annahme einer Gauß-Verteilung ns $p > 0,05$, *** $p < 0,01$. Folgende Abkürzungen werden verwendet: TRIAC; 3,5,3'-Trijodthyroessigsäure, SD; Standardabweichung.

Aus den hier dargestellten Ergebnissen wird ersichtlich, dass *SLC29A2/ENT2* und *SLC22A9/OAT7* das T3-Analogon $^{125}\text{I-TRIAC}$ transportieren können, jedoch nicht $^{125}\text{I-Tr}_3$ und $^{125}\text{I-T}_3$ (Abb. 22). Dies weist auf eine selektive Substratspezifität zum T3-Analogon $^{125}\text{I-TRIAC}$ hin, welches im Vergleich zu $^{125}\text{I-T}_3$ und $^{125}\text{I-rT}_3$ eine Essigsäuregruppe besitzt. Die ausbleibende Aufnahme von $^{125}\text{I-T}_3$ und $^{125}\text{I-rT}_3$ weist zudem darauf hin, dass es sich bei *SLC29A2/ENT2* und *SLC22A9/OAT7* um keine physiologischen Jodthyronin-Transporter handelt.

Aus den hier dargestellten Ergebnissen geht zudem hervor, dass die $^{125}\text{I-TRIAC}$ -Aufnahme in *SLC22A9/OAT7*-Überexpressionsklonen bei Zugabe des Kompetitors

DITPA und Sobetirome reduziert wird (Abb. 23). Dies weist darauf hin, dass *SLC22A9/OAT7* Jodthyronin-Analogen und Derivate transportieren kann. Die kompetitive Hemmung der ^{125}I -TRIAC-Aufnahme durch DITPA und Sobetirome erfolgt durch Bindung an der gleichen Bindestelle wie ^{125}I -TRIAC innerhalb des *SLC22A9/OAT7*-Transportproteins.

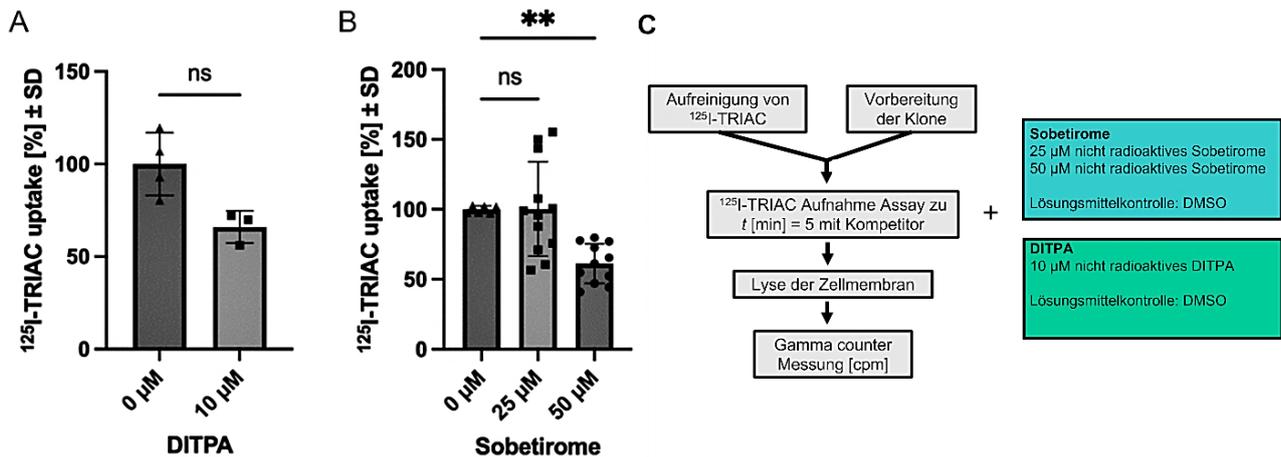


Abbildung 23: Transportfähigkeit von ^{125}I -TRIAC in *SLC22A9/OAT7*-Überexpressionsklonen bei Co-Inkubation mit nicht-radioaktivem DITPA und Sobetirome nach 5 Minuten. Aus der Abbildung geht die ^{125}I -TRIAC-Aufnahme in *SLC22A9/OAT7*-Überexpressionsklonen bei Co-Inkubation mit 10 μM nicht-radioaktivem DITPA hervor (A). Hierbei ist ersichtlich, dass bei Co-Inkubation mit 10 μM nicht-radioaktivem DITPA der ^{125}I -TRIAC-Transport in die Zelle reduziert wird (A). Aus Abbildung geht die ^{125}I -TRIAC-Aufnahme in *SLC22A9/OAT7*-Überexpressionsklonen bei Co-Inkubation mit 25 μM und 50 μM nicht-radioaktivem Sobetirome hervor (B). Hierbei ist ersichtlich, dass bei Co-Inkubation mit 25 μM nicht-radioaktivem Sobetirome der ^{125}I -TRIAC-Transport in die Zelle beeinträchtigt ist (B). Aus der Co-Inkubation mit 50 μM nicht-radioaktivem Sobetirome geht eine signifikante Reduktion des ^{125}I -TRIAC-Transports in die Zelle hervor (B). Die Endpunkt-Bestimmung erfolgt bei t [min] = 5 (C). Anschließend werden die Zellen lysiert und im Gammazähler gemessen (C). Untransfizierte MDCK1-Zellen, welche nur mit dem Lösungsmittel behandelt werden, fungieren als Lösungsmittelkontrolle. Das verwendete Lösungsmittel ist MeOH (C). Alle Werte werden auf die Lösungsmittelkontrolle normalisiert. Statistik: ungepaarter nicht-parametrischer-Mann-Whitney-Test für *SLC29A2/ENT2* ns $p > 0,05$. Ungepaarte-parametrische-one-way-ANOVA unter Annahme einer Gauß-Verteilung ns $p > 0,05$, ** $p < 0,01$. Folgende Abkürzungen werden verwendet: TRIAC; 3,5,3'-Trijodthyroessigsäure, DITPA; 3,5-Dijodthyreopropionsäure, DMSO; Dimethylsulfoxid, SD; Standardabweichung.

3.1.8 *SLC22A9/OAT7* ist ein schwacher ^{125}I -TETRAC-Transporter

Des Weiteren wird untersucht, ob es sich bei *SLC22A9/OAT7* auch um einen ^{125}I -TETRAC-Transporter handelt.

TETRAC besitzt im Vergleich zu ^{125}I -TRIAC ein weiteres Jodatom an 5' Position des äußeren Benzolrings und weist somit eine strukturelle Ähnlichkeit zu TRIAC auf. *SLC29A2/ENT2*-Transportproteine können nach Durchführung des radioaktiven ^{125}I -TETRAC-Aufnahme Experiments als potenzielle ^{125}I -TETRAC-Transporter exkludiert werden, da diese keine zeitabhängige ^{125}I -TETRAC-Aufnahme zeigen (Ergebnisse nicht gezeigt). Es besteht kein Unterschied hinsichtlich der ^{125}I -TETRAC-Aufnahme zwischen den *SLC29A2/ENT2*-Überexpressionsklonen und den untransfizierten MDCK1-Zellen (Ergebnisse nicht gezeigt). Aus der Zeitverlaufsanalyse geht eine Aufnahme von ^{125}I -TETRAC in *SLC22A9/OAT7* exprimierenden Zellen bei Erhöhung der Substratmenge mit 10 μM und 20 μM nicht-radioaktiven TETRAC hervor (Abb. 24). Die Co-Inkubation von ^{125}I -TETRAC und notwendige Zugabe von 20 μM nicht-radioaktivem TETRAC weisen auf eine schwache Transportfähigkeit des *SLC22A9/OAT7*-Transportproteins für ^{125}I -TETRAC hin. Untransfizierte MDCK1-Zellen fungieren als Negativkontrolle und werden als Hintergrund subtrahiert.

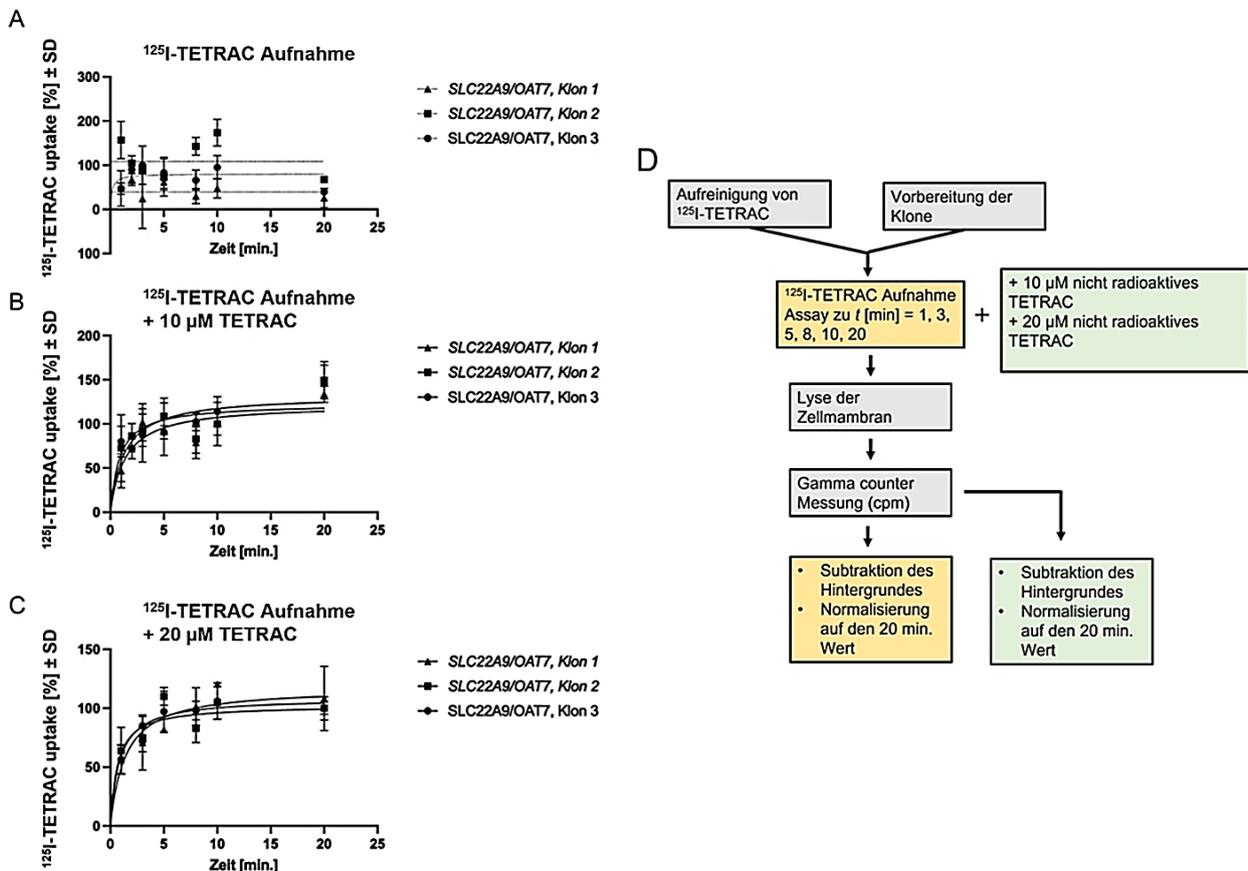


Abbildung 24: Transportaktivität und Zeitverlaufsanalyse von ^{125}I -TETRAC in *SLC22A9/OAT7*-Überexpressionsklonen.

werden mit ^{125}I -TETRAC (A), als auch unter Co-Inkubation von ^{125}I -TETRAC mit 10 μM (B) und 20 μM (C) nicht-radioaktiven TETRAC behandelt ($n=3$). Aus Abbildung geht keine ^{125}I -TETRAC-Aufnahme bei Behandlung der Klone mit dem alleinigen radioaktiven ^{125}I -TETRAC hervor ($R = -0,04841 - 0,01371$) (A). Aus der Co-Inkubation von ^{125}I -TETRAC mit 10 μM nicht-radioaktiven TETRAC wird eine zeitabhängige ^{125}I -TETRAC-Aufnahme ($R = 0,2694 - 0,4848$) ersichtlich (B). Die Steigerung der Substratmenge auf 20 μM nicht-radioaktiven TETRAC führt zu einer erhöhten Transportaktivität und optimierten zeitabhängigen Verlaufskurve ($R = 0,4309 - 0,6956$) (C). Die Bestimmung der Messzeitpunkte erfolgt jeweils zu $t [\text{min}] = 1, 3, 5, 8, 10, 20$ (D). Anschließend werden die Zellen lysiert und die ^{125}I -TETRAC-Aufnahme mittels Gammazähler gemessen (D). Untransfizierte MDCK1-Zellen fungieren als Negativkontrolle und werden als Hintergrund subtrahiert (D). Alle Klone sind auf den 20 min Messzeitpunkt normalisiert (D). Letzteres wird als 100 % definiert, wodurch die Kombination voneinander unabhängiger Experimente möglich ist. Folgende Abkürzungen werden verwendet: TETRAC; 3,5,3',5'-Tetraiodthyroessigsäure, SD; Standardabweichung.

In einem nachfolgenden Aufnahme-Assay wird ^{125}I -TETRAC verwendet, da es als desaminiertes-Analogon von L-Thyroxin (T4) eine strukturelle Ähnlichkeit zu ^{125}I -TRIAC besitzt. In diesem Kontext kann *SLC22A9/OAT7* ebenfalls als schwacher ^{125}I -TETRAC-Transporter identifiziert werden. Bei einer Konzentration von 10 μM nicht-radioaktiven TRIAC ist bereits eine zeitabhängige ^{125}I -TRIAC-Aufnahme ersichtlich. *SLC22A9/OAT7* zeigt bei Zugabe von 20 μM nicht-radioaktiven TETRAC einen deutlichen zeitabhängigen Transport von ^{125}I -TETRAC. Die Affinität von TRIAC zum *SLC22A9/OAT7*-Transportprotein ist demnach höher als die Affinität von TETRAC zum *SLC22A9/OAT7*-Transportprotein, weshalb TRIAC einen niedrigeren K_M -Wert hat. Entsprechend den hier dargestellten Ergebnissen sind somit höhere TETRAC Konzentration erforderlich, um eine vergleichbare Transportaktivität zu erreichen.

SLC22A9/OAT7 und *SLC29A2/ENT2* sind somit Transportproteine für das Schilddrüsenhormon-Analogon ^{125}I -TRIAC, wobei *SLC22A9/OAT7* zuzüglich ^{125}I -TETRAC transportieren kann. Dass *SLC22A9/OAT7* sowohl ^{125}I -TRIAC als auch ^{125}I -TETRAC, jedoch nicht ^{125}I -T3 und ^{125}I -rT3 transportieren kann, bestätigt dessen Spezifität für Jodthyronin-Essigsäuren. Zudem kann die ^{125}I -TRIAC-Aufnahme in *SLC22A9/OAT7*-Überexpressionsklonen durch Zugabe von nicht-radioaktivem DITPA und Sobetirome kompetitiert werden, weshalb *SLC22A9/OAT7* ebenfalls ein DITPA- und Sobetirome-Transporter sein kann. Die Ergebnisse zeigen, dass es sich bei *SLC22A9/OAT7* um einen wichtigen Transporter mit klinischer Relevanz bei der Aufnahme von Jodthyronin-Analoga und Derivate handelt.

3.2 Merkmale von Mausmodellen des Allan-Herndon-Dudley-Syndroms

3.2.1 Mct8^{L223R/y} Mäuse zeigen eine signifikante Gewichtsreduktion im Vergleich zu Mct8^{+/y} Mäuse

Es erfolgt eine Untersuchung dahingehend, ob zwischen den Mausmutanten Unterschiede hinsichtlich der biometrischen Parameter, sowie Morphologie des Gehirns bestehen. Ziel ist es, die jeweilige Punktmutation anhand der Position innerhalb des Mct8/MCT8-Transportproteins zu untersuchen und charakterisieren.

Nach Euthanasie durch CO₂-Exposition werden die biometrischen Parameter Körperlänge mit in- und exkludiertem Schwanz vermessen, sowie das Gewicht der 28 Tage alten Mct8^{+/y}, Mct8^{L366W/y}, Mct8^{P253L/y} und Mct8^{L223R/y} Mäuse bestimmt (Abb. 25). Mct8^{L366W/y} und Mct8^{P253L/y} Mausmutanten weisen weder hinsichtlich der Körperlänge noch in Bezug auf das Körpergewicht signifikante Unterschiede zu Mct8^{+/y} Mäusen auf. Mct8^{L223R/y} Mausmutanten zeigen eine signifikante Gewichtsreduktion im Vergleich zu Mct8^{+/y} Tiere. Es sind keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Körperlänge mit und ohne kaudal Fortsatz zwischen Mct8^{L223R/y} und Mct8^{+/y} Mäusen ersichtlich.

Weiterhin sind nach Entnahme der Gehirne keine erkennbaren Veränderungen bezüglich der Gehirnmorphologie in Mct8^{L366W/y}, Mct8^{P253L/y} und Mct8^{L223R/y} Mausmutanten im Vergleich zum WT ersichtlich (Abb. 26). Sowohl die Struktur als auch die Form der Gehirne aller Mausmutanten sind physiologisch und wildtypisch. Es sind keine erkennbaren Unterschiede hinsichtlich der linken und rechten Hemisphären ersichtlich. Die Medulla oblongata, Cerebellum, Gyri und Sulci sind unauffällig.

Aufgrund des reduzierten Gewichts von Mct8^{L223R/y} Mäusen im Vergleich zum WT werden die Mausmutanten zur weiteren Quantifizierung herangezogen. Überdies erfolgt eine Quantifizierung mit den Mct8^{L366W/y} Mausmutanten. Diese zeigen wildtypische biometrische Parameter bezüglich der Körperlänge und des Körpergewichts.

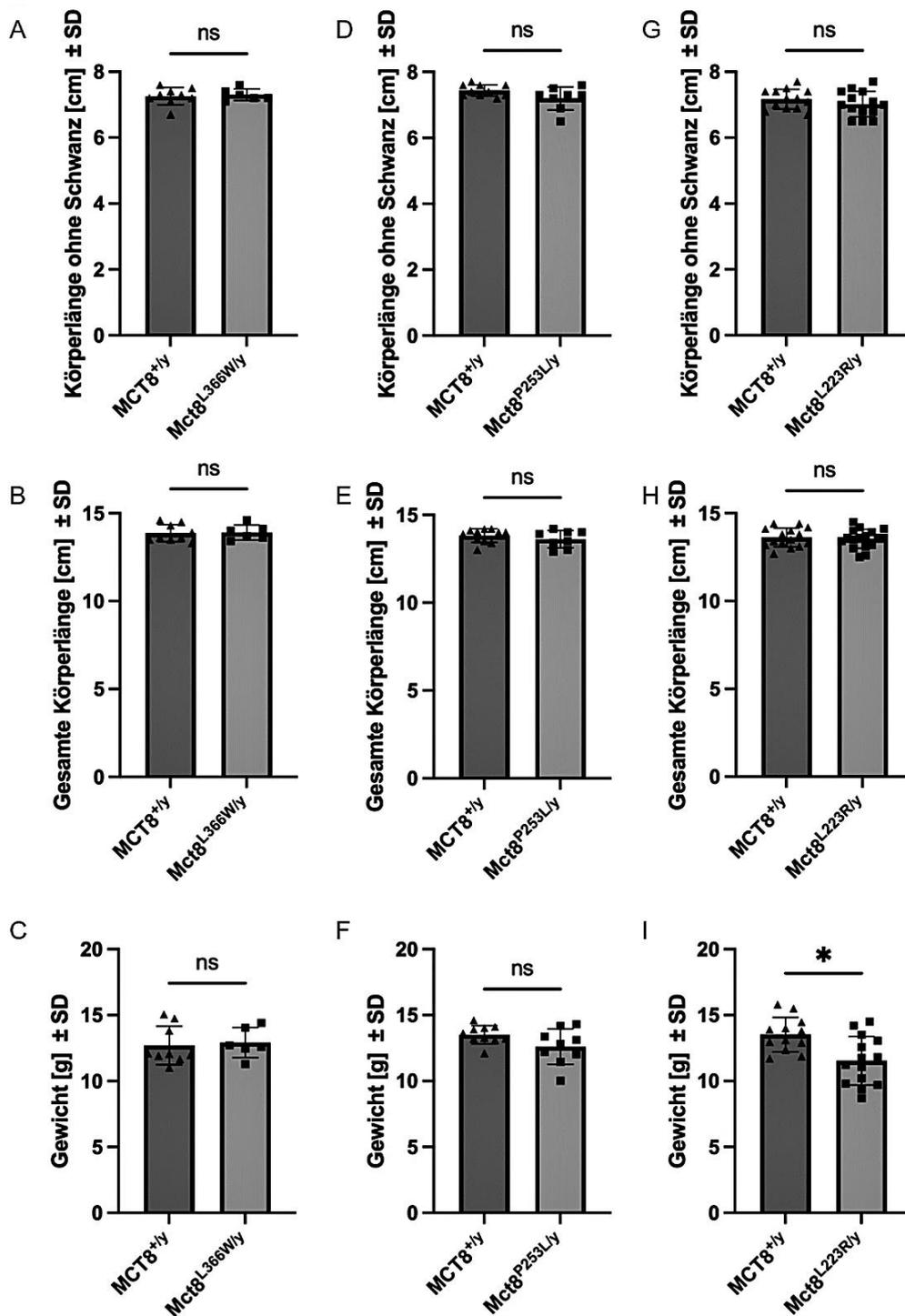


Abbildung 25: Körperlänge und Körpergewicht von 4-Wochen alten Mct8^{+/y}, Mct8^{L366W/y} (A, B, C), Mct8^{P253L/y} (D, E, F) und Mct8^{L223R/y} (G, H, I) Mäusen. Mct8^{L366W/y} (n=8) Mäuse weisen keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der vermessenen Körperlänge und dem Körpergewicht im Vergleich zu Mct8^{+/y} (n=8) Tieren auf (A, B, C). Mct8^{P253L/y} (n=8) Mäuse weisen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der vermessenen Körperlänge und dem Körpergewicht im Vergleich zu Mct8^{+/y} (n=8) Tieren auf (D, E, F). Mct8^{L223R/y} (n=8) Mausmutanten weisen eine wildtypische Körperlänge (G, H) auf, wohingegen das Körpergewicht von Mct8^{L223R/y} Mäusen (I) mit durchschnittlich 11 g ± SD

im Vergleich zu $Mct8^{+/y}$ Mäusen (I), welche ein durchschnittliches Körpergewicht von $14 \text{ g} \pm \text{SD}$ aufweisen, signifikant reduziert ist. Statistik: Ungepaarter-nicht-parametrischer-Mann-Whitney-Test ns $p > 0,05$, $*p < 0,05$. Folgende Abkürzungen werden verwendet: SD: Standardabweichung.

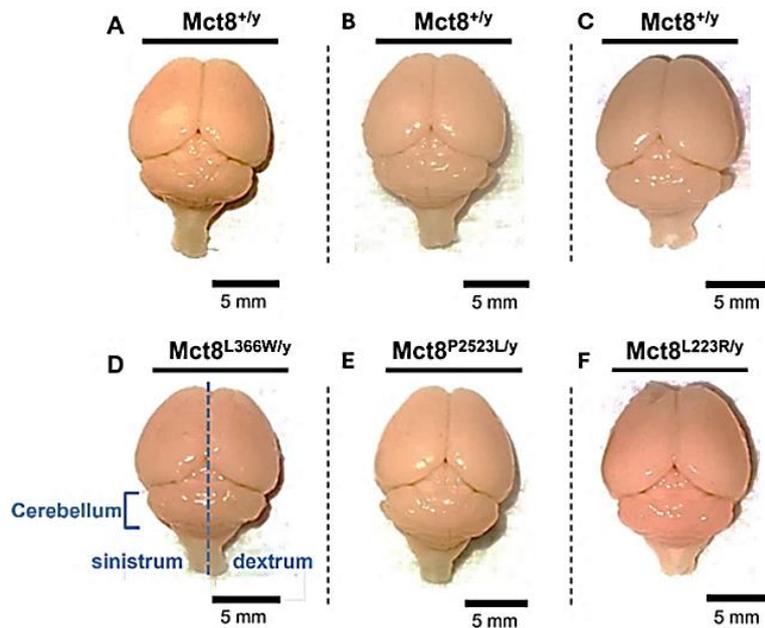


Abbildung 26: Repräsentative Makroskopie eines $Mct8^{+/y}$ (A, B, C), $Mct8^{L366W/y}$ (D), $Mct8^{P2523L/y}$ (E) und $Mct8^{L223R/y}$ (F) Gehirns. $Mct8^{L366W/y}$ Mausmutanten weisen eine makroskopisch wildtypische Morphologie hinsichtlich des Cerebellums, sowie dem hemisphaerium cerebri sinistrum und hemisphaerium cerebri dextrum auf (A, D). Zwischen $Mct8^{P2523L/y}$ und $Mct8^{+/y}$ bestehen ebenfalls keine visuell ersichtlichen Unterschiede hinsichtlich der Struktur und Morphologie des Cerebellums, als auch den Hemisphären (B, E). $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutanten weisen eine wildtypische Morphologie und Gehirnstruktur auf (C, F). Das Cerebellum, sowie hemisphaerium cerebri sinistrum und hemisphaerium cerebri dextrum sind physiologisch (C, F). Maßstab: 5 mm.

Aus der Analyse der Körperlänge und des Gewichts von $Mct8^{L366W/y}$ und $Mct8^{P2523L/y}$ Mausmutanten gehen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu $Mct8^{+/y}$ Mäusen hervor. $Mct8^{L223R/y}$ Mäuse zeigen hingegen eine Reduktion des Körpergewichts. Dies kann auf metabolische, molekulare oder physiologische Unterschiede im Vergleich zu $Mct8^{+/y}$ Mäusen hindeuten. Die hier dargestellten Mausmutanten zeigen bei Entnahme der Gehirne keine visuell erkennbaren morphologischen Veränderungen zwischen den Hemisphären oder dem Cerebellum. Demnach führen mögliche metabolische, molekulare und physiologische Veränderungen im Kontext des $Mct8$ -Defekts in $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutanten zu keinen visuell erkennbaren makroskopischen Veränderungen im Gehirn. Die murinen $Mct8$ - und humanen $MCT8$ -Transportproteine besitzen eine

unterschiedliche Sequenzlänge zwischen den Spezies. Die korrespondierende humane MCT8^{L434W/y} Mutation ist innerhalb von Helix 8 lokalisiert (Abb. 27). Die MCT8^{P321L/y} Mutation befindet sich in Helix 5, während die MCT8^{L291R/y} Mutation in Helix 4 vorhanden ist (Abb. 27).

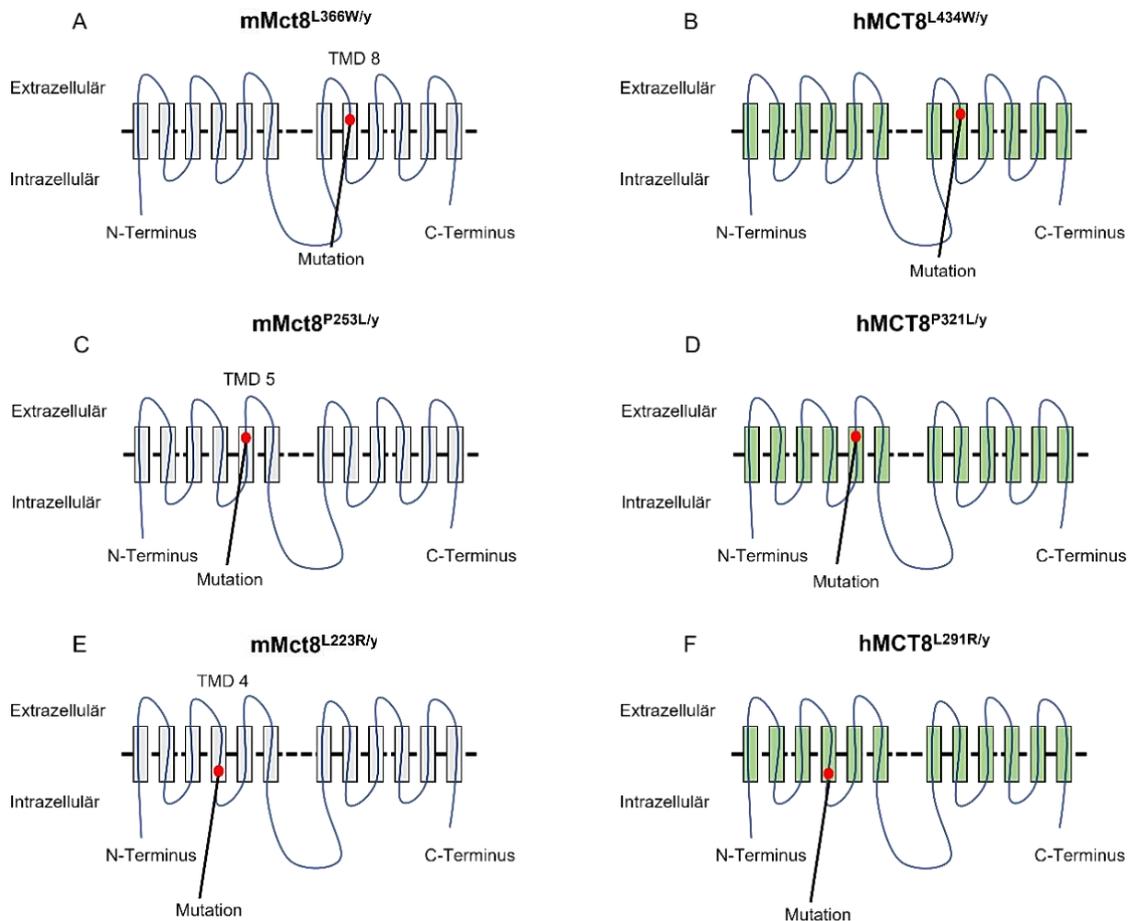


Abbildung 27: Schematische Darstellung der murinen Mct8-Punktmutationen, sowie der entsprechenden korrespondierenden humanen MCT8-Punktmutationen. Das Mct8/MCT8-Transportprotein besteht aus 12 α-helicalen Segmenten (TMS) mit intrazellulär lokalisierten N- und C-Terminus. Die murine Mct8^{L366W/y} (A) Mutation befindet sich in TMD 7 und die korrespondierende humane MCT8^{L434W/y} (B) Mutation ebenfalls in TMD 7. Die mMct8^{P253L/y}/hMCT8^{P321L/y} (C, D) Punktmutation ist in TMD 5 des Proteins lokalisiert, während die mMct8^{L223R/y}/hMCT8^{L291R/y} (E, F) Mutation jeweils in TMD 4 lokalisiert ist.

Zur Darstellung und Analyse der hier vorliegenden Mutation wird die vorgegebene 3D-Struktur aus der AlphaFold-Datenbank verwendet. AlphaFold ist ein KI-System, mittels welchem die 3D-Struktur eines Proteins anhand dessen Aminosäuresequenz mit einer gewissen Genauigkeit vorhergesagt werden kann. Als Maß fungiert ein Test zur

Vorhersage lokaler Abstandsdifferenzen (pLDDT), welcher eine Skalierung von 0-100 umfasst und die Vertrauenswürdigkeit der vorhergesagten Struktur schätzt. Hohe Werte weisen auf eine hohe Vertrauenswürdigkeit hin. Im Weiteren wird die Software I-Mutant zur Analyse der Proteinstabilität hinzugezogen. I-Mutant ist ein Vorhersageprogramm zur Proteinstabilitätsveränderung bei einer bestehenden Punktmutation und wird anhand der Proteinsequenz bestimmt. Hierbei gibt der $\Delta\Delta G$ Wert die Änderung der freien Energie an. Je negativer der Wert hierbei wird, desto stärker wird das Protein infolge der Mutation destabilisiert. Aus der Darstellung mittels der AlphaFold-Datenbank geht eine Lokalisation der Mausmutanten Mct8^{L366W/y} (hMCT8^{L434W/y}, $\Delta\Delta G = -0,4$) und Mct8^{P253L/y} (hMCT8^{P321L/y}, $\Delta\Delta G = 0,28$) im äußeren Bereich des Proteins hervor (Abb. 28). Diese Bereiche sind mit der Substratbindestelle assoziiert. Bei der bestehenden murinen Mct8^{L366W/y} (hMCT8^{L434W/y}) wird Leucin mit Tryptophan substituiert. Leucin ist eine hydrophobe, unpolare Aminosäure, welche mit hydrophoben Resten interagiert. Tryptophan ist hydrophob, mit aromatischen Ring, sowie zusätzlich konjugierten Elektronen. Tryptophan ist geringfügig polarer als Leucin ist. Bei einem Austausch von Leucin zu Tryptophan kann es zu veränderten Wechselwirkungen innerhalb des Proteins kommen, da Tryptophan mit anderen aromatischen Seitenketten interagieren kann. Zudem ist Tryptophan größer als Leucin, wodurch die Proteinstabilität geringfügig beeinträchtigt werden kann. Somit kann die Mct8^{L366W/y} (hMCT8^{L434W/y}) Punktmutation die Substratbindestelle geringfügig beeinträchtigen. Bei der Mct8^{P253L/y} (hMCT8^{P321L/y}) Mutation wird ein Prolin mit Leucin substituiert. Prolin besitzt eine Ringstruktur zur Seitenkette, wodurch Peptidbindungen innerhalb von α -Helices und β -Faltblättern in spezifische Winkel gebracht werden. Ein Austausch von Prolin zu Leucin beeinträchtigt die Ausrichtung und Faltung des Proteins und kann zu einer Destabilisierung der dreidimensionalen Struktur innerhalb der Substratbindestelle führen. Dies geht mit einem eingeschränkten Transport von Substraten einher. Bei der Mct8^{L223R/y} (hMCT8^{L434R/y}, $\Delta\Delta G = -1,53$) Mutation wird das hydrophobe und unpolare Leucin mit einem Arginin substituiert. Arginin ist eine basische, polare Aminosäure mit positiver Ladung, welche zudem stark hydrophil ist. Bei einem Austausch von Leucin zu Arginin kann Arginin ionische Wechselwirkungen mit weiteren Resten eingehen. Arginin ist ein sterisch größeres Molekül als Leucin und hat eine Guanidion-Seitenkette, welche mit polaren Gruppen interagiert. Eine Punktmutation innerhalb des Proteins führt folglich zu einer

Destabilisierung und Veränderung der gesamten Proteinstruktur und kann dessen Faltung und Translokation beeinträchtigen.

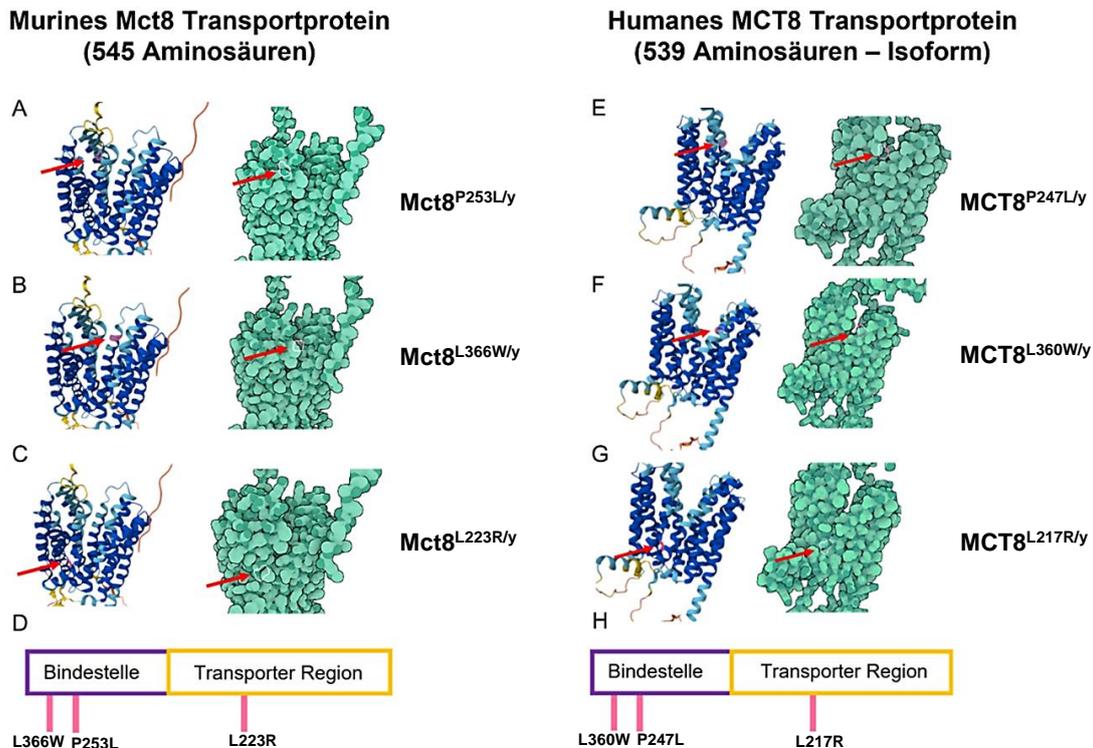


Abbildung 28: Schematische und strukturelle Darstellung der murinen und humanen Punktmutation innerhalb des Mct8/MCT8-Transportproteins und dessen Lokalisation. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass die murine mMct8^{P253L/y} (A) und humane hMCT8^{P247L/y} Mutation (E) im äußeren Bereich des Transportproteins lokalisiert ist. mMct8^{L366W/y} /hMct8^{L360W/y} Mutanten (B, F) weisen ebenfalls eine Mutation im äußeren Bereich des Transportproteins auf und somit im Bereich der Substratbindestelle (D, H). Die mMct8^{L223R/y}/hMCT8^{L217R/y} (C, G) Punktmutation ist innerhalb des Transportproteins lokalisiert (D, H). In der hier gezeigten Abbildung wird die kurze humane Isoform des MCT8-Transportproteins (539 AS) verwendet, um die Punktmutationen darzustellen. Die humane Punktmutationen MCT8^{P247L/y}, MCT8^{L360W/y} und MCT8^{L217R/y} entsprechen der kurzen Isoform des humanen MCT8-Transportproteins (539 AS) und stellen die korrespondierenden Punktmutationen zu den murinen Mausmutanten Mct8^{P253L/y}, Mct8^{L366W/y} und Mct8^{L223R/y} dar. Die lange humane Isoform des humanen MCT8-Transportproteins (613 AS) weist eine Extension um 74 AS auf. Legende zur Modellkonfidenz der AlphaFold-Struktur: dunkelblau; sehr hoch (pLDDT > 90), hellblau; hoch (90 > pLDDT > 70), gelb; niedrig (70 > pLDDT > 50), orange; sehr niedrig (pLDDT < 50). Folgende Abkürzungen werden verwendet: AS; Aminosäuren, pLDDT; Test zur Vorhersage lokaler Abstandsdifferenzen.

3.2.2 Mct8^{L223R/y} Mausmutanten weisen eine signifikant Parvalbumin und Calbindin Reduktion im Vergleich zu Mct8^{+/y} Mäusen auf

Im Weiteren wird eine histologische Charakterisierung von Mct8^{L223R/y}, Mct8^{L366W/y} und Mct8^{P253L/y} Mausmutanten hinsichtlich der Zellzahl und Fluoreszenzintensität von Parvalbumin (PV), Calretinin (CR), Calbindin (CB) und neuronaler Nukleus (NeuN)-positiven Zellen im Barrel-Feld des primären-somatosensorischen-Kortex 1 (S1BF) erfolgen. Dies erfolgt mit der CellProfiler Software, wodurch die zu untersuchenden Interneuronen als Objekte erkannt werden. Dies ermöglicht zudem die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität (Objektintensität). Weiterhin wird die Myelinintensität im Cingulum des Corpus Callosum und das perineuronale Netz charakterisiert. Ziel ist die Charakterisierung der jeweiligen Mausmutanten hinsichtlich histologischer Veränderungen im Gehirn. Zudem besteht das Ziel darin, zu untersuchen, welche der Mausmutanten den potenziell schwerwiegendsten neurologischen Phänotyp haben könnte.

Anhand des Mausgehirn-Atlas (Maus.brain-map.org/static/atlas) werden für alle Mausmutanten jeweils Schnitte gewählt, welche die Auszählung von Zellen im primären-somatosensorischen-Kortex 1 (ssp) und Barrel-Feld (BF) ermöglichen. Zur Untersuchung der Mct8^{L366W/y} und Mct8^{L223R/y} Mausmutanten werden die tendenziell anterior liegenden Schnitte an Position 47 – 51 von 132 (Maus.brain-map.org/static/atlas), sowie die eher posterior gelegenen Positionen 68 – 74 von 132 (Maus.brain-map.org/static/atlas) gewählt. Für Mct8^{P253L/y} und Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-} Mäuse werden jeweils die Positionen 62- 64 von 132 (Maus.brain-map.org/static/atlas) ausgewählt. Alle Schnitte haben eine Schnittdicke von 35 µm. Zur Bestimmung der Zellzahl werden je 1-2 anterior liegende Schnitt, sowie 1-2 posterior liegende Schnitt von jedem Tier quantifiziert. Für jeden anterior liegenden Schnitt wird die gleiche Anzahl posterior gelegener Schnitte Fluoreszenz gefärbt.

Immunhistologische Fluoreszenzfärbungen sollen der weiteren Charakterisierung von Mct8^{L366W/y} und Mct8^{L223R/y} Mausmutanten dienlich sein. In der Literatur werden insbesondere PV, CR, CB und Myelin zur Untersuchung der Auswirkungen einer MCT8-Defizienz (MCT8^{-/-}) verwendet. PV, CR und CB sind Interneuronen, welche von physiologischen T3-Werten im Gehirn abhängen und sensitiv auf einen T3-Mangel

reagieren. Überdies sind T3-abhängige Gene essenziell für Myelinisierungsprozesse im Gehirn, wodurch eine physiologische Signalweiterleitung gewährleistet werden kann. *Wisteria floribunda* Agglutinin (WFA) ist ein neuer potenzieller sowie indirekter Marker für einen T3-Mangel, da WFA insbesondere Bestandteile des perineuronalen Netz (PNN) detektiert, welches PV-positive Zellen umgibt. Letzteres ist vorwiegend in der S1BF-Region lokalisiert und in hoher Dichte vorzufinden, weshalb insbesondere in der Literatur die S1BF-Region zur histologischen Untersuchung von PV-positiven Zellen bei einem MCT8-Defekt hinzugezogen wird. Zunächst werden Kryoschnitte angefertigt und jeweils Schnitte aus der anterioren und posterioren Region des Gehirns isoliert. Anschließend wird die Zellzahl DAPI-gefärbter Zellen (Abb. 29; Abb. 30; Abb. 31), sowie spezifischer Interneuron wie Parvalbumin (PV) (Abb. 29; Abb. 30), Calretinin (CR) (Abb. 29; Abb. 30) und Calbindin (CB) bestimmt.

Zudem werden im Weiteren Zellen, bei welchen Bestandteile des PNN mittels WFA detektiert werden können, in der hier vorliegenden Arbeit als WFA-positive Zellen definiert. Es wird die Zellzahl WFA-positiver Zellen, als auch dessen Fluoreszenzintensität, bestimmt. Hierbei erfolgt die Umsetzung unter Verwendung der open-source Software CellProfiler (windows Ver. 4.2.4). Die Analyse und Auswertung der Immunfärbung von Myelin im Cingulum des Corpus Callosum, bei der Fluoromyelin verwendet wird, erfolgt mittels ImageJ (ImageJ-win64).

PV ist insbesondere in GABAergen Interneuronen der S1-Region und im Hippocampus exprimiert, während CB vorwiegend in Purkinje-Zellen des Cerebellums, sowie Interneuronen des Kortex und vorwiegend in der S1-Region des Großhirns exprimiert wird. CR wird ebenfalls in Interneuronen des Cortex, Amakrinzellen der Retina und im Hippocampus exprimiert. Zudem wird CR auch in Cajal-Retzius-Zellen und Körnerzellen exprimiert.

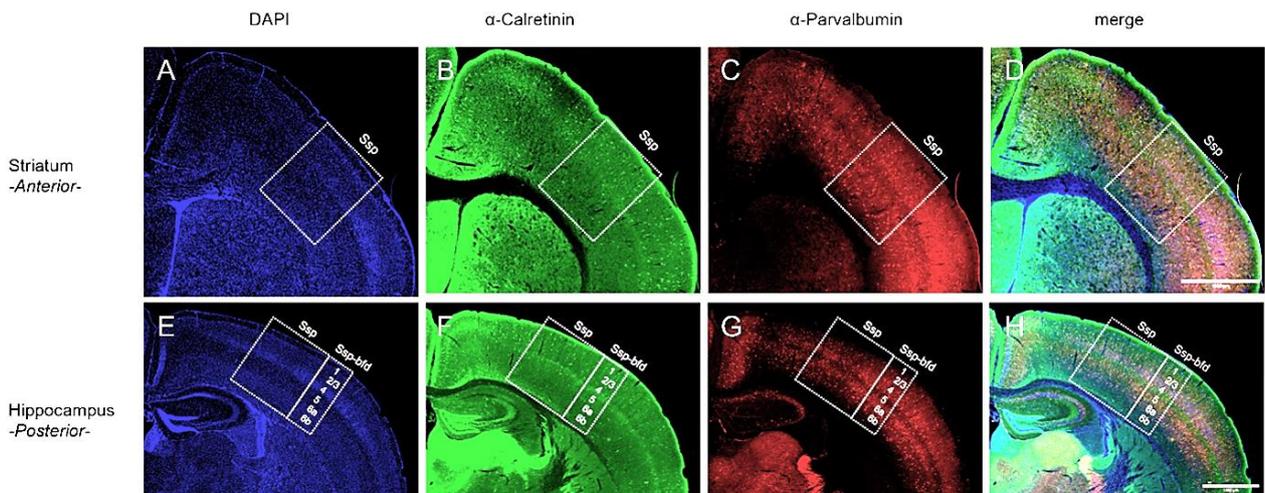


Abbildung 29: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von Gehirnschnitten mit markiertem (weißes Rechteck) primären-somatosensorischen-Kortex 1 (A, B, C, D) und Barrel-Feld (E, F, G, H). Der Isokortex ist in 6 Schichten unterteilt (1, 2/3, 4, 5, 6a, 6b). Diese inkludieren die äußere Molekularschicht unterhalb der Pia-mater (1), sowie äußere Körnerschicht (2) und Pyramidenschicht (3). Weiterhin besteht der Isokortex aus der inneren Körnerschicht (5), sowie Pyramidenschicht (6a). Die multiforme Schicht (6b) stellt die innerste Schicht des Isokortex dar. Die hier dargestellten Bilder zeigen repräsentative anteriore (A, B, C, D) und posteriore (E, F, G, H) Regionen, welche zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität und Zellzählung verwendet werden. Die hier repräsentativ dargestellten Regionen (weißes Rechteck) werden zur Bestimmung DAPI-gefärbten Zellen, sowie PV-, CR- und WFA-positiven Zellen verwendet. Weiterhin werden die Fluoreszenzkanäle kombiniert und überlagert dargestellt (D, H). Folgende Abkürzungen werden verwendet: Ssp; primärer-somatosensorischer Kortex, BFD; Barrel-Feld. Maßstab: 1000 μ m.

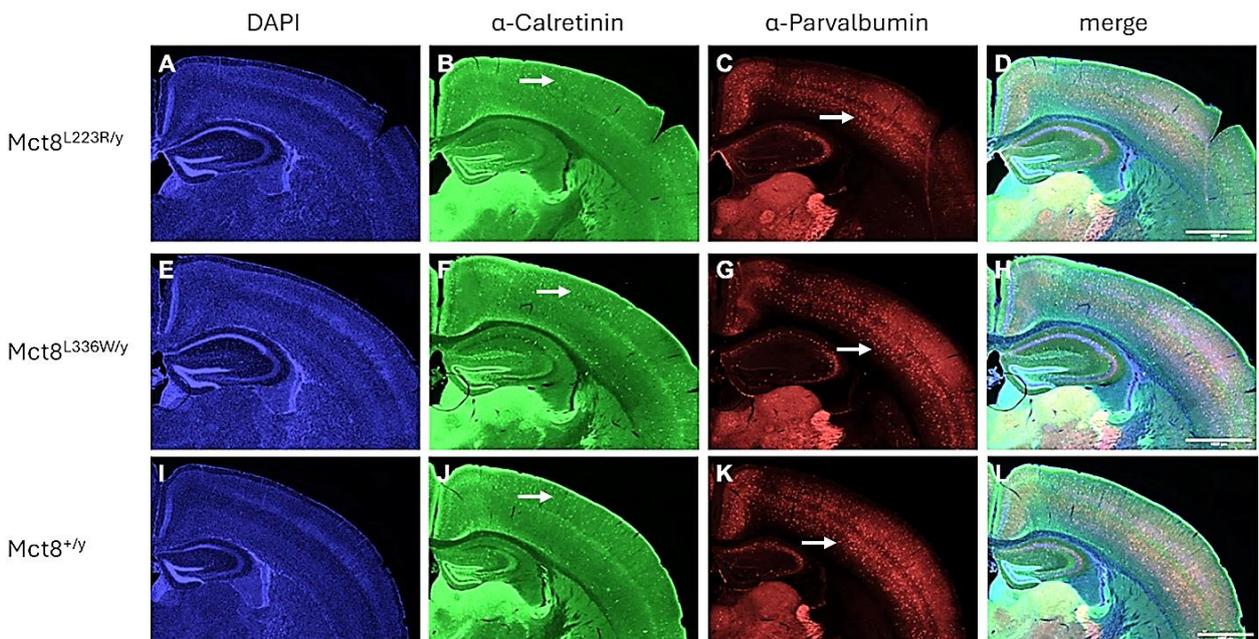


Abbildung 30: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung von DAPI-gefärbten Zellen, sowie Calretinin (CR)- und Parvalbumin (PV)-positiven Zellen in der S1BF-Region von $Mct8^{L223R/y}$ (A, B, C, D), $Mct8^{L366W/y}$ (E, F, G, H) und $Mct8^{+/y}$ (I, J, K, L), Gehirnschnitten. Bei den hier vorliegenden Gewebeschnitten handelt es sich um Gefrierschnitte. Visuell ist kein Unterschied hinsichtlich der Zellzahl DAPI-gefärbter Zellen (A, E, I) ersichtlich. Zudem besteht eine visuell wildtypische Zellzahl CR-positiver Zellen in $Mct8^{L223R/y}$ (B) und $Mct8^{L366W/y}$ (F) Mäusen. Es ist kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zellzahl PV-positiver Zellen zwischen $Mct8^{L366W/y}$ (G) und $Mct8^{+/y}$ (K) Mäusen ersichtlich, wohingegen $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutanten eine optisch geringfügige Reduktion PV-positiver Zellen zeigen (C). Es sind keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der Fluoreszenzintensität von CR (B, F, J) und PV-positiven Zellen (C, G, K) zwischen den Tieren ersichtlich. Weiterhin werden die Fluoreszenzkanäle kombiniert und überlagert dargestellt (D, H, L). Folgende Abkürzungen werden verwendet: PV; Parvalbumin, CR; Calretinin, DAPI; 4',6-Diamidino-2-phenylindol, Ssp; primärer-somatosensorischer Kortex, BFD; Barrel-Feld. Maßstab: 1000 μm .

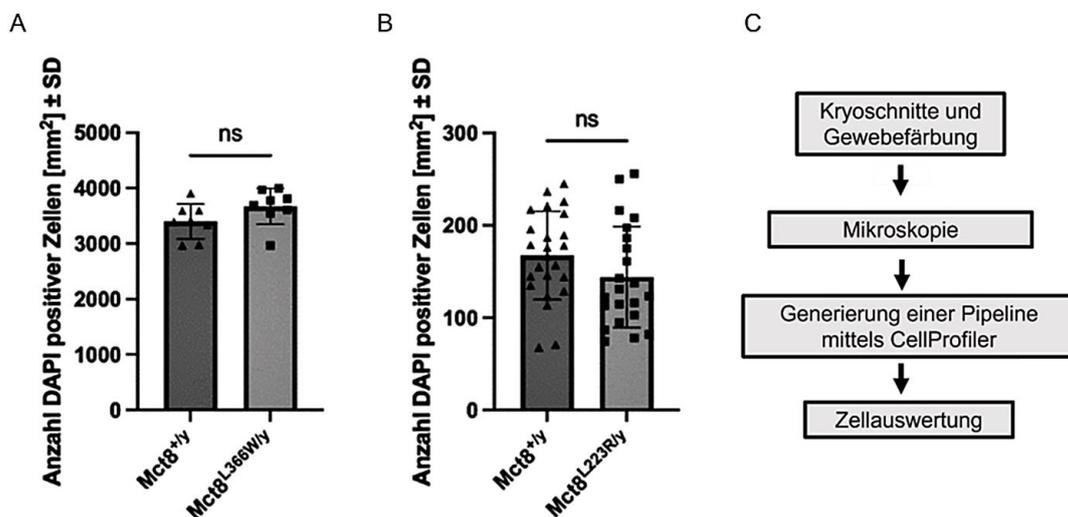


Abbildung 31: Zellzahl DAPI-gefärbter Zellen im primären-somatosensorischen-Kortex 1 von $Mct8^{+/y}$, $Mct8^{L366W/y}$ (A) und $Mct8^{L223R/y}$ (B) Mäusen. Es ist kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zellzahl DAPI-gefärbter Zellen zwischen $Mct8^{+/y}$ und $Mct8^{L366W/y}$ (A), sowie zwischen $Mct8^{+/y}$ und $Mct8^{L223R/y}$ (B) Mäusen ersichtlich. Die Quantifizierung der Gehirnschnitte erfolgt hierbei mittels der CellProfiler Software (C). Die Generierung einer Pipeline zur Zellerkennung ermöglicht nachfolgend die Quantifizierung und Auswertung der Gewebeschnitte (C). Statistik: Ungepaarter-nicht-parametrischer-Mann-Whitney-Test ns $p > 0,05$. Folgende Abkürzungen werden verwendet: DAPI; 4',6-Diamidino-2-phenylindol, SD; Standardabweichung, ns; nicht signifikant.

Das sowohl $Mct8^{L223R/y}$, als auch $Mct8^{L366W/y}$ Mausmutanten keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der Zellzahl DAPI-gefärbter Zellen in der S1-Region des Gehirns zeigen, weist darauf hin, dass es im Kontext der jeweiligen Mutation zu keinem signifikanten Verlust von Zellen innerhalb der S1-Region des Gehirns gekommen ist. Somit besteht eine normale Entwicklung der globalen Zellpopulationen und Zellviabilität in der S1-Region des Gehirns. Dennoch ist eine leichte Reduktion hinsichtlich der Zellzahl DAPI-gefärbter Zellen in den $Mct8^{L223R/y}$ Mäusen im Vergleich zu $Mct8^{+/y}$ Tieren ersichtlich, wohingegen $Mct8^{L366W/y}$ Mausmutanten eine wildtypische Zellzahl DAPI-gefärbter Zellen zeigen.

Die $Mct8^{L366W/y}$ Mausmutanten zeigen keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der Zellzahl PV-positiver Zellen in der S1-Region des Gehirns (Abb. 32). $Mct8^{L366W/y}$ Mäuse weisen somit eine normale Entwicklung der globalen Zellpopulationen und Zellviabilität in der S1-Region auf (Abb. 32). Zudem besteht eine wildtypische Zellzahl CR-positiver Zellen in der S1-Region von $Mct8^{L366W/y}$ Mausmutanten (Abb. 33). Dennoch ist eine leichte Erhöhung hinsichtlich der Zellzahl PV-positiver Zellen in $Mct8^{L366W/y}$ Mäusen im Vergleich zu $Mct8^{+/y}$ Tieren ersichtlich, wohingegen $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutanten eine signifikante Reduktion hinsichtlich der Zellzahl PV-positiver Zellen zeigen (Abb. 32). Es besteht kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zellzahl CR-positiver Zellen in der S1-Region von $Mct8^{L223R/y}$ Mäusen (Abb. 33).

Entsprechend den histologischen Untersuchungen könnten $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutanten einen schwerwiegenderen neurologischen Phänotyp im Vergleich zu $Mct8^{L366W/y}$ Mäusen haben. Die Ergebnisse zeigen, dass PV-positive Zellen sensitiv auf einen T3-Mangel im Gehirn reagieren. Die Ergebnisse zeigen, dass $Mct8^{L223R/y}$ Mäuse signifikante Reduktionen in einigen wenigen spezifischen Zellpopulationen zeigen, woraus sich ein lokaler Effekt spezifischer Populationen für die S1-Region ergibt. Die PV-Fluoreszenzintensität ist in den $Mct8^{L366W/y}$ und $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutanten wildtypisch (Abb. 32). Folglich besteht keine Verringerung hinsichtlich der PV-Expression innerhalb der verbleibenden Zellen in der S1-Region des Gehirns. Zudem ist sowohl die Zellzahl als auch Fluoreszenzintensität von CR-positiven Zellen in der S1-Region des Gehirns von $Mct8^{L223R/y}$ und $Mct8^{L366W/y}$ Mäusen wildtypisch (Abb. 33). Folglich besteht eine normale Entwicklung der globalen Zellpopulationen und Zellviabilität von CR-positiven Zellen.

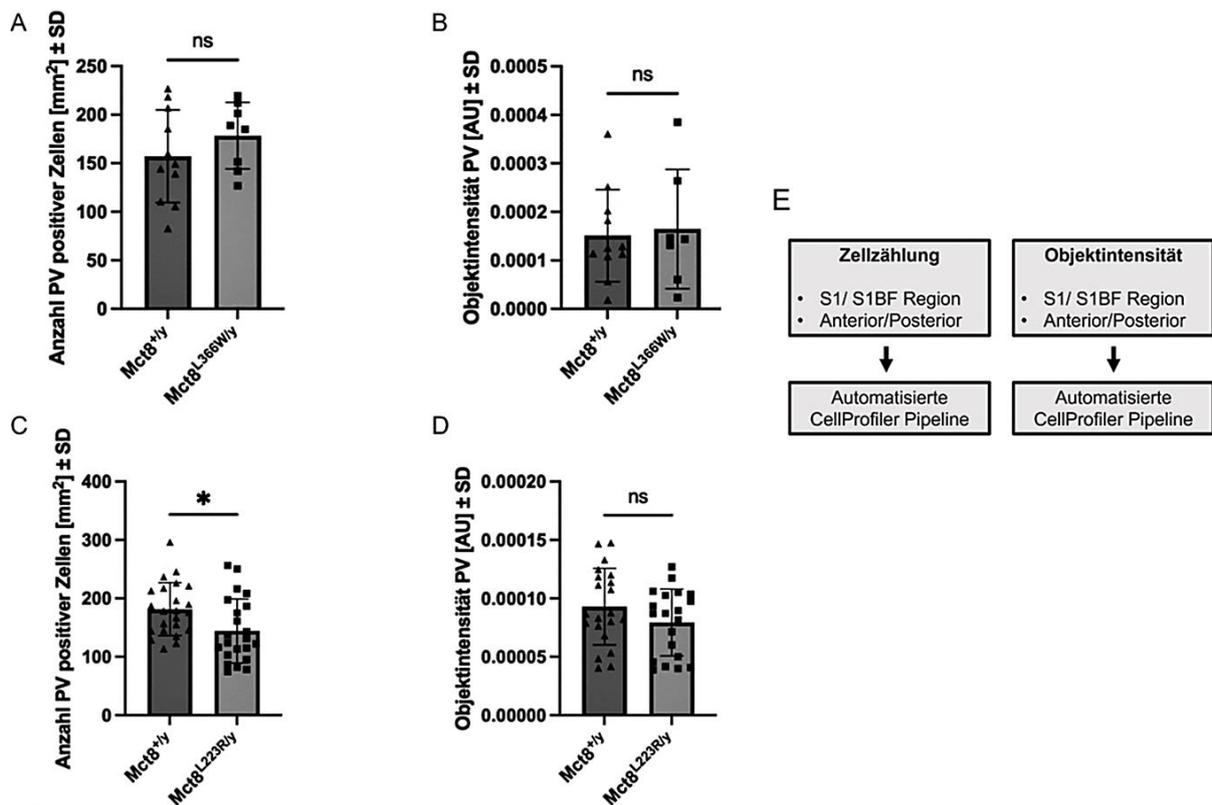


Abbildung 32: Zellzahl und Fluoreszenzintensität von PV-positiven Zellen im primären-somatosensorischen-Kortex 1 von Mct8^{+/y}, Mct8^{L366W/y} und Mct8^{L223R/y} Mäusen. Mct8^{L366W/y} Mausmutanten zeigen eine wildtypische Zellzahl PV-positiver Zellen (A). Mct8^{L366W/y} Mausmutanten zeigen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Fluoreszenzintensität von PV-positiven Zellen im Vergleich zur Fluoreszenzintensität von PV-positiven Zellen in Mct8^{+/y} Tieren (B). Mct8^{L223R/y} Mausmutanten weisen eine signifikante Reduktion hinsichtlich der Zellzahl PV-positiver Zellen auf (C), während keine Reduktion in Bezug auf die Fluoreszenzintensität von PV-positiven Zellen im Vergleich zu Mct8^{+/y} Mäusen besteht (D). Die Quantifizierung der Gehirnschnitte kann mittels der CellProfiler Software erfolgen (E). Hierbei erfolgt eine Zellzählung PV-positiver Zellen in der S1BF-Region von sowohl anterior als auch posterior gelegenen Gehirnschnitten (E). PV-positive Zellen werden mittels CellProfiler als Objekte erkannt und deren Zellzahl, sowie Fluoreszenzintensität bestimmt (E). Statistik: Ungepaarter-nicht-parametrischer-Mann-Whitney-Test ns p>0,05. Folgende Abkürzungen werden verwendet: PV; Parvalbumin, SD; Standardabweichung, ns; nicht signifikant.

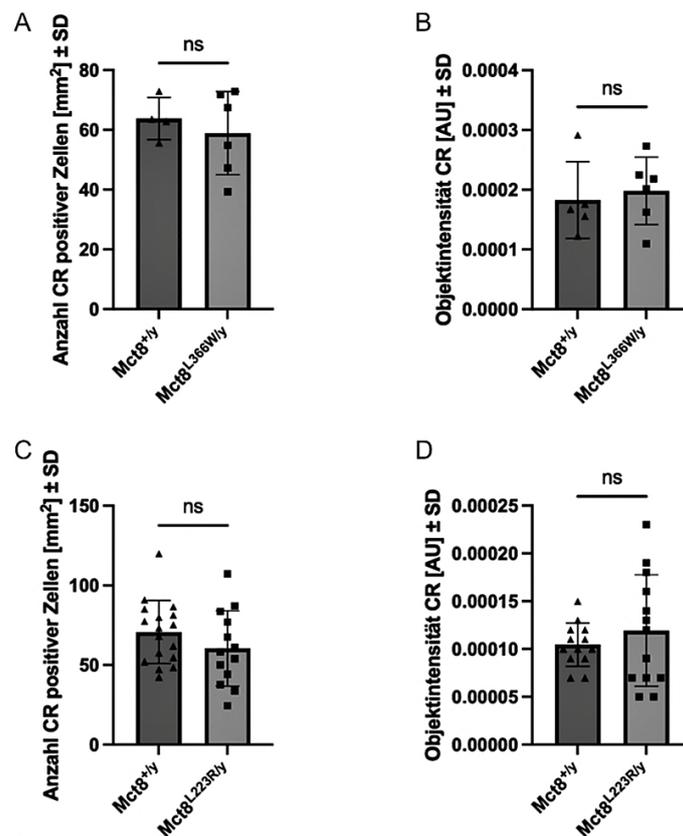


Abbildung 33: Zellzahl und Fluoreszenzintensität von CR-positiven Zellen im primären-somatosensorischen-Kortex 1 von Mct8^{+/y}, Mct8^{L366W/y} und Mct8^{L223R/y} Mäusen. Mct8^{L366W/y} Mausmutanten zeigen eine wildtypische Zellzahl CR-positiver Zellen (A). Mct8^{L366W/y} Mausmutanten zeigen zudem keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Fluoreszenzintensität von CR-positiver Zellen im Vergleich zur Fluoreszenzintensität von CR-positiver Zellen in Mct8^{+/y} Tieren (B). Mct8^{L223R/y} Mausmutanten weisen eine wildtypische Zellzahl CR-positiver Zellen in der S1BF-Region auf (C). Zudem besteht keine signifikante Reduktion hinsichtlich der CR-Fluoreszenzintensität im Vergleich zu Mct8^{+/y} Mäusen (D). Statistik: Ungepaarter-nicht-parametrischer-Mann-Whitney-Test ns $p > 0,05$. Folgende Abkürzungen werden verwendet: CR; Calretinin, SD; Standardabweichung, ns; nicht signifikant.

Im Weiteren erfolgt zuzüglich eine Detektion von Bestandteilen des perineuronalen Netz (PNN) mittels WFA. Das PNN ist vorwiegend um PV-positive Zellen lokalisiert und somit besonders verdichtet in der S1BF-Region vorzufinden (Abb. 34). Zudem ist das PNN im Hippocampus, Cerebellum und Amygdala lokalisiert und besteht aus Proteoglykanen wie Aggrecan, Versican, Neurocan und Brevican.

Mct8^{L366W/y} Mäuse zeigen eine wildtypische Zellzahl PV- und WFA-positiver Zellen in der S1-Region (Abb. 35; Abb. 36). Ebenso besteht kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Fluoreszenzintensität (Abb. 35; Abb. 36). Es besteht eine signifikante Reduktion

hinsichtlich der Zellzahl PV-positiver Zellen in der S1-Region von $Mct8^{L223R/y}$ Mäusen (Abb. 35; Abb. 37). Es besteht keine signifikante Reduktion hinsichtlich der Zellzahl WFA-positiver Zellen oder deren Fluoreszenzintensität zwischen $Mct8^{L223R/y}$ und $Mct8^{+/y}$ Mäusen (Abb. 35; Abb. 37). Zudem ist die Fluoreszenzintensität von PV und dem PNN, dessen Bestandteile mittels WFA detektiert werden können, wildtypisch (Abb. 35; Abb. 37). Aus der linearen Regressionsanalyse von $Mct8^{L223R/y}$ und $Mct8^{+/y}$ Mäusen (Abb. 37), sowie von $Mct8^{L366W/y}$ und $Mct8^{+/y}$ Mäusen (Abb. 36) ergibt sich eine Korrelation von PV- und WFA-positiven Zellen.

Den hier dargestellten Ergebnissen ist zu entnehmen, dass bei einem T3-Mangel im Gehirn die Zellzahl PV- und WFA-positiver Zellen reduziert sein kann. PV-positive Zellen reagieren sensitiv auf einen T3-Mangel des Gehirns, wohingegen das PNN insgesamt weniger stark beeinträchtigt wird. Das PNN stabilisiert synaptische Verbindungen und unterstützt hierdurch die Signalweiterleitung zwischen Neuronen. $Mct8^{L366W/y}$ und $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutanten zeigen keine Reduktion hinsichtlich der Zellzahl WFA-positiver Zellen, weshalb das bestehende PNN in beiden Mausmutanten intakt sein könnte und weiterhin eine stabile Signalweiterleitung gewährleistet. $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutanten könnten einen schwerwiegenderen neurologischen Phänotyp haben.

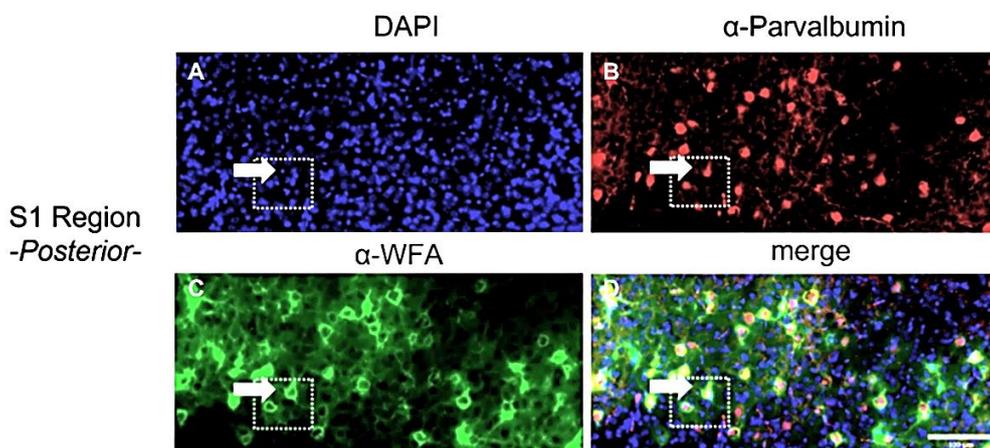


Abbildung 34: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung der S1BF-Region eines koronalen Gefrierschnitts mit Detektion von DAPI-gefärbten Zellen, sowie PV- und WFA-positiven Zellen. In der Abbildung sind DAPI-gefärbte Zellen (A) sowie PV-positive Zellen (B) ersichtlich (weißes Quadrat). Zudem geht eine Detektion WFA-positiver Zellen (C) hervor (weißes Quadrat). Aus der überlagerten Darstellung der Fluoreszenzkanäle (D) ist ersichtlich, dass das perineuronale Netz insbesondere GABAerge, sowie PV-positive Zellen umgibt (weißes Quadrat) (D). Die höchste Dichte besitzt das perineuronale Netz um somatische Regionen und apikalen Dendriten, während die Dichte um axonale

Regionen und basale Dendriten reduziert ist (C, D). Folgende Abkürzungen werden verwendet: PV; Parvalbumin, CR; Calretinin, Maßstab: 100 μm .

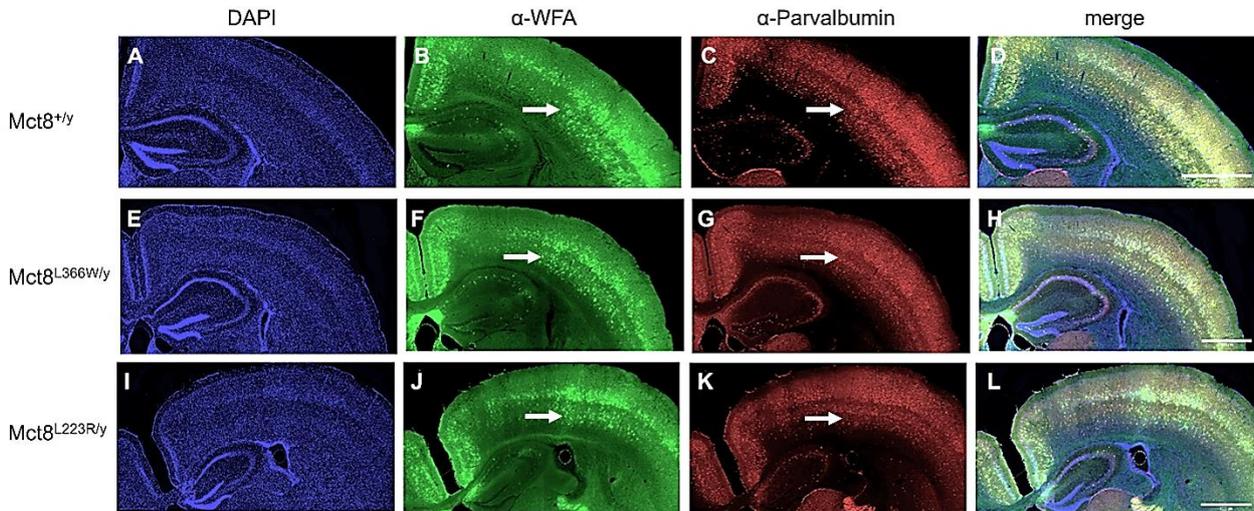


Abbildung 35: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung DAPI-gefärbter Zellen, sowie PV- und WFA-positiven Zellen in der S1-Region von $Mct8^{+/y}$, $Mct8^{L223R/y}$ und $Mct8^{L366W/y}$ Mäusen. Bei den hier vorliegenden Gewebeschnitten des Gehirns handelt es sich um Gefrierschnitte. Visuell ist kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zellzahl DAPI-gefärbter Zellen zwischen $Mct8^{+/y}$ (A), $Mct8^{L366W/y}$ (E) und $Mct8^{L223R/y}$ (I) Tieren ersichtlich. Optisch besteht kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zellzahl WFA-positiver Zellen, sowie der Fluoreszenzintensität von WFA-positiven Zellen zwischen $Mct8^{+/y}$ (B), $Mct8^{L366W/y}$ (F) und $Mct8^{L223R/y}$ (J) Mäusen. Weiterhin ist eine physiologische Zellzahl und Verteilung PV-positiver Zellen im Gehirn von $Mct8^{+/y}$ Mäusen (C) ersichtlich. $Mct8^{L366W/y}$ Mausmutanten zeigen eine optisch wildtypische Zellzahl PV-positiver Zellen (G), während in $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutanten eine geringfügige Reduktion PV-positiver Zellen hervorgeht (K). Es besteht optisch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Fluoreszenzintensität von PV-positiven Zellen zwischen $Mct8^{+/y}$ (C), $Mct8^{L366W/y}$ (G) und $Mct8^{L223R/y}$ (K) Mäusen. Weiterhin werden die Fluoreszenzkanäle kombiniert und überlagert dargestellt (D, H, L). Folgende Abkürzungen werden verwendet: PV; Parvalbumin, WFA; *Wisteria floribunda* Agglutinin, DAPI; 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI). Maßstab: 1000 μm .

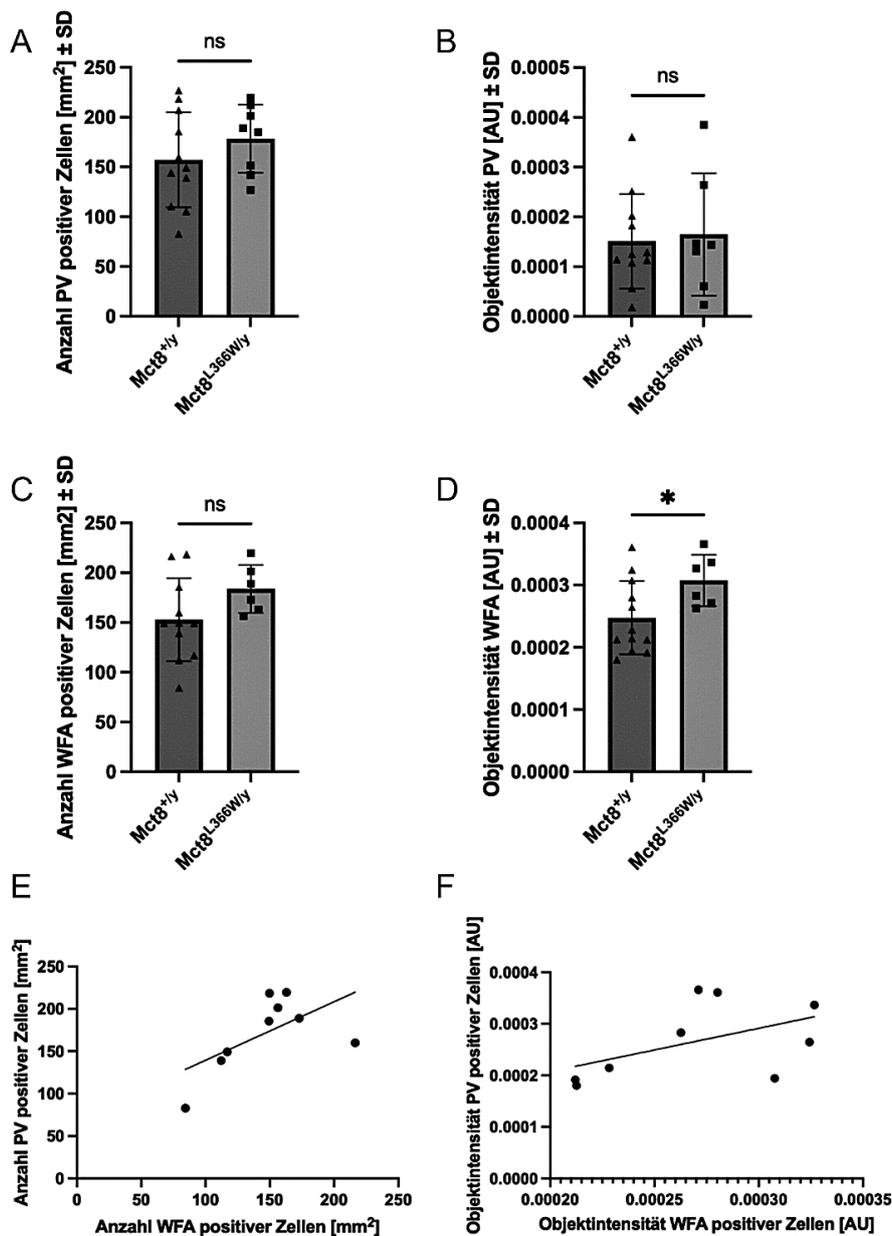


Abbildung 36: Zellzahl, Fluoreszenzintensität und Korrelation von PV- und WFA-positiven Zellen im primären-somatosensorischen-Kortex 1 von Mct8^{+/y} und Mct8^{L366W/y} Mäusen. Mct8^{L366W/y} Mäuse zeigen keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Zellzahl (A) sowie Fluoreszenzintensität (B) von PV-positiven Zellen im Vergleich zu Mct8^{+/y} Mäusen. Es besteht kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zellzahl WFA-positiver Zellen in Mct8^{L366W/y} Mausmutanten im Vergleich zu Mct8^{+/y} Mäusen (C). Mct8^{L366W/y} Mausmutanten weisen eine signifikante Erhöhung hinsichtlich der Fluoreszenzintensität WFA-positiver Zellen auf (D). Aus der Abbildung geht ein linearer Zusammenhang hinsichtlich der Zellzahl PV-positiver Zellen und WFA-positiver Zellen hervor ($R^2 = 0,3674$, $m = 0,6898$) (E). Überdies besteht eine geringe lineare Korrelation in Bezug auf die Fluoreszenzintensität von PV- und WFA-positiven Zellen ($R^2 = 0,2537$, $m = 0,8402$) (F) innerhalb der S1BF-Region. Statistik: Ungepaarter-nicht-parametrischer-

Mann-Whitney-Test ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$. Folgende Abkürzungen werden verwendet: PV; Parvalbumin, WFA; *Wisteria floribunda* Agglutinin, SD; Standardabweichung, ns; nicht signifikant.

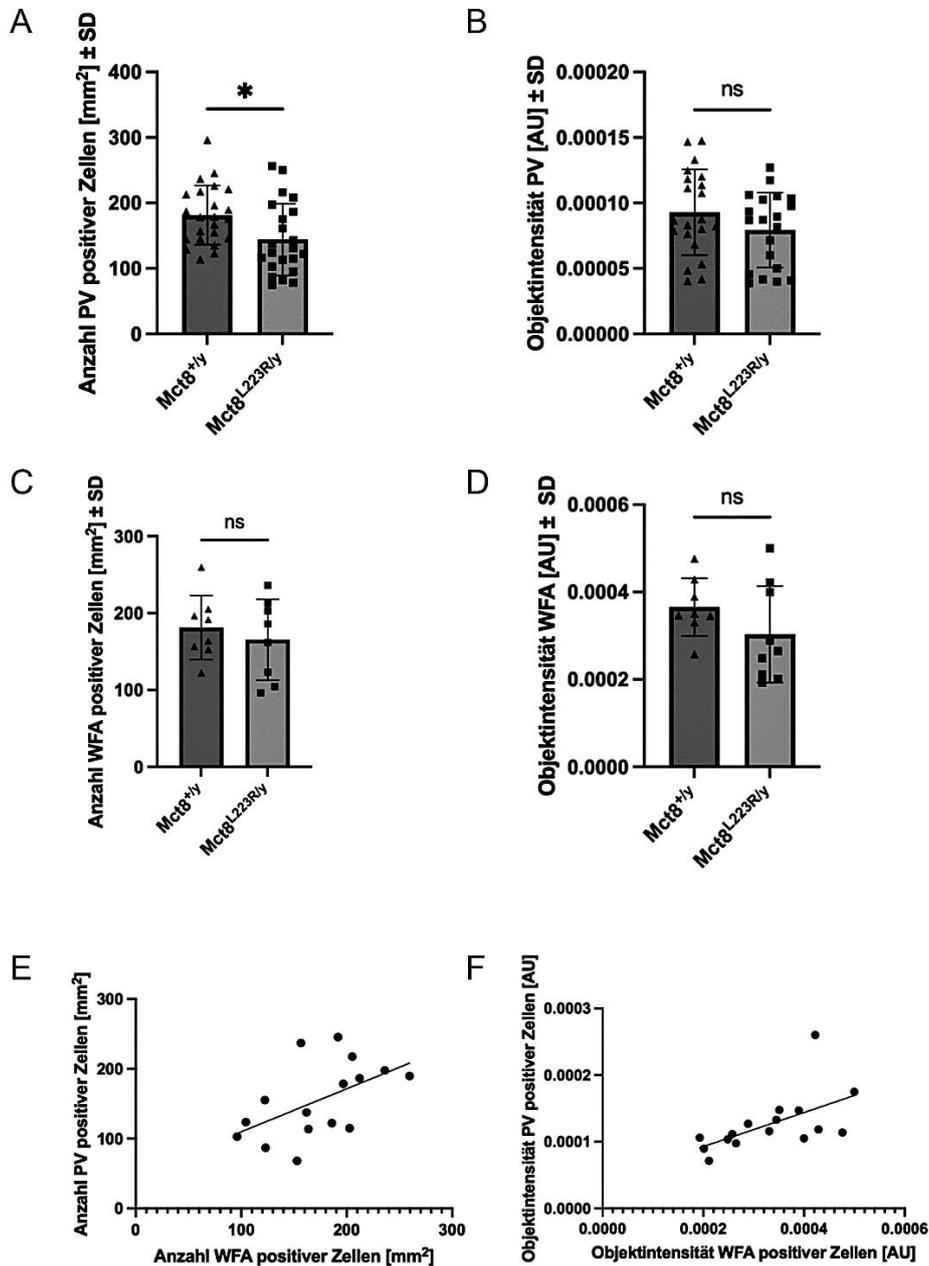


Abbildung 37: Zellzahl, Fluoreszenzintensität und Korrelation von PV- und WFA-positiven Zellen im primären-somatosensorischen-Kortex 1 von Mct8^{+/y} und Mct8^{L223R/y} Mäusen. Mct8^{L223R/y} Mausmutanten zeigen eine signifikante Reduktion hinsichtlich der Zellzahl PV-positiver Zellen im Vergleich zu Mct8^{+/y} Mäusen (A). Es besteht kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Fluoreszenzintensität von PV-positiven Zellen im Vergleich zu Mct8^{+/y} Mäusen (B). Es besteht kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zellzahl (C) sowie Fluoreszenzintensität (D) WFA-positiver Zellen in Mct8^{L223R/y} Mausmutanten im Vergleich zu Mct8^{+/y} Mäusen. Es besteht ein linearer Zusammenhang

hinsichtlich der Zellzahl PV- und WFA-positiver Zellen in $Mct8^{+/y}$ und $Mct8^{L223R/y}$ Tieren ($R^2 = 0,2821$, $m = 0,6164$) (E). Überdies besteht eine lineare Korrelation hinsichtlich der Fluoreszenzintensität von PV- und WFA-positiven Zellen ($R^2=0,3347$, $m = 0,2557$) (F). Statistik: Ungepaarter-nicht-parametrischer-Mann-Whitney-Test ns $p>0,05$, * $p<0,05$. Folgende Abkürzungen werden verwendet: PV; Parvalbumin, WFA; *Wisteria floribunda* Agglutinin, SD; Standardabweichung, ns; nicht signifikant.

Im Weiteren wird die Zellzahl und Fluoreszenzintensität von CB-positiven Zellen in der S1BF-Region bestimmt (Abb. 38). Die $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutante zeigt eine Reduktion hinsichtlich der Zellzahl von CB-positiven Zellen in der S1-Region von Layer 6a/6b, während die CB-Fluoreszenzintensität unverändert ist (Abb. 39; Abb. 40). $Mct8^{L366W/y}$ Mausmutanten zeigen keine Reduktion hinsichtlich der Zellzahl CB-positiver Zellen, sowie der CB-Fluoreszenzintensität (Abb. 39; Abb. 40). $Mct8^{L223R/y}$ Mäuse könnten somit einen schwerwiegenderen neurologischen Phänotyp im Vergleich zu $Mct8^{L366W/y}$ Mäusen haben. Aus dem signifikanten Unterschied zwischen den $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutanten und $Mct8^{+/y}$ Mäusen in Layer 6a/6b ergibt sich eine layerspezifische Auswirkung der $Mct8$ -Punktmutation auf die kortikale Zellpopulation (Abb. 39; Abb. 40).

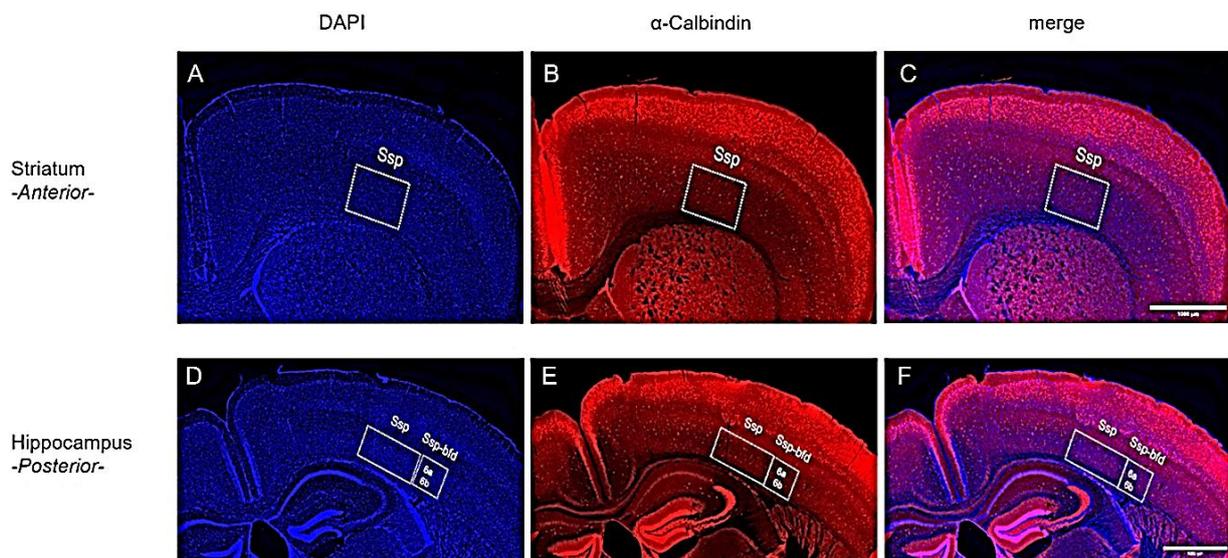


Abbildung 38: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von Gehirnschnitten mit markiertem (weißes Rechteck) primären-somatosensorischen-Kortex 1 (A, B, C) und Barrel-Feld (D, E, F). Weiterhin ist die Pyramidenschicht (6a), sowie multiforme Schicht (6b) des Isokortex gezeigt (D, E, F). Die hier dargestellten Bilder zeigen repräsentative anteriore (A, B, C) und posteriore (D, E, F) Regionen, welche zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität und Zellzählung verwendet werden. Die hier dargestellten Regionen (weißes Rechteck) werden zur Bestimmung CB-positiver Zellen verwendet. Weiterhin werden die Fluoreszenzkanäle kombiniert und überlagert dargestellt (C, F).

Folgende Abkürzungen werden verwendet: Ssp; primärer-somatosensorischer Kortex, BFD; Barrel-Feld, CB; Calbindin. Maßstab: 1000 μm .

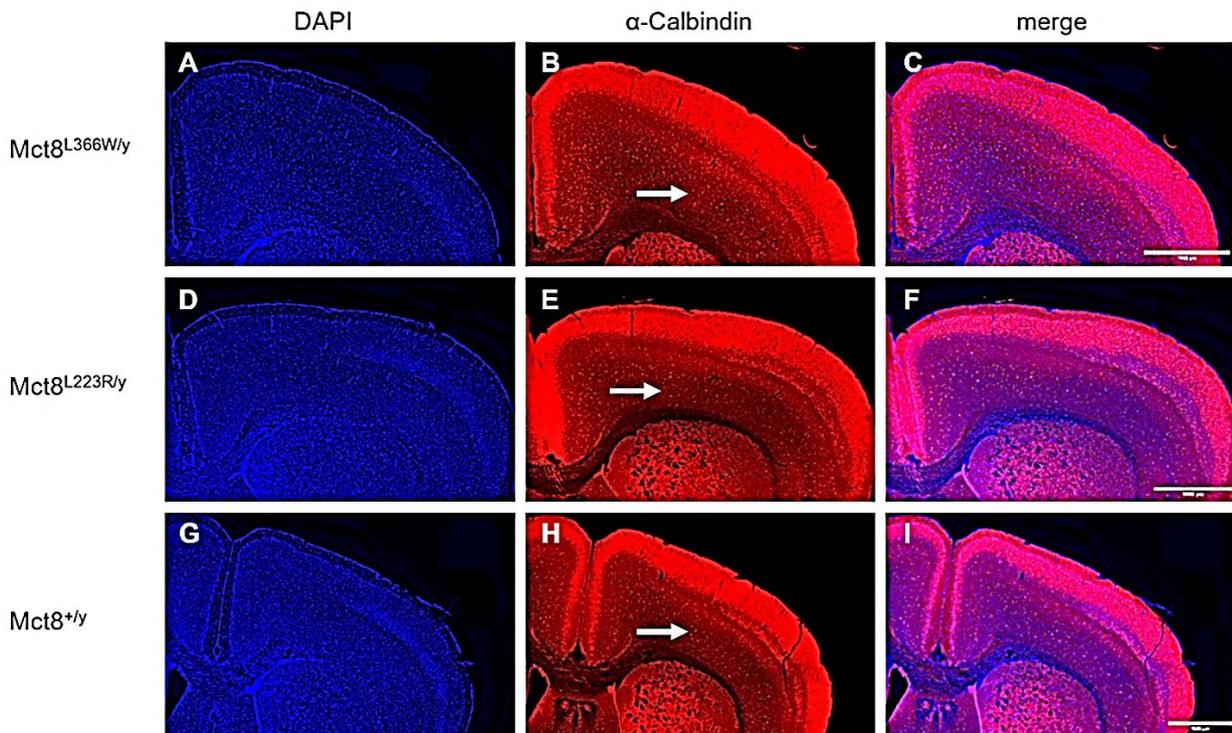


Abbildung 39: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung von DAPI-gefärbten Zellen und Calbindin positiven Zellen in der S1-Region von $Mct8^{+/y}$, $Mct8^{L223R/y}$ und $Mct8^{L366W/y}$ Mäusen. Bei den hier vorliegenden Gewebeschnitten des Gehirns handelt es sich um Gefrierschnitte. Visuell ist kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zellzahl DAPI-gefärbter Zellen zwischen $Mct8^{+/y}$ (A), $Mct8^{L223R/y}$ (D) und $Mct8^{L366W/y}$ (G) Tieren ersichtlich. Die $Mct8^{L366W/y}$ Mutante zeigt augenscheinlich eine wildtypische Zellzahl CB-positiver Zellen (B), wohingegen aus der $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutante eine optische Reduktion in Bezug auf die Zellzahl CB-positiver Zellen (E) in der S1-Region im Vergleich zu $Mct8^{+/y}$ Mäusen (H) hervorgeht. Weiterhin werden die Fluoreszenzkanäle kombiniert und überlagert dargestellt (C, F, I). Folgende Abkürzungen werden verwendet: CB; Calbindin, DAPI; 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI). Maßstab: 1000 μm .

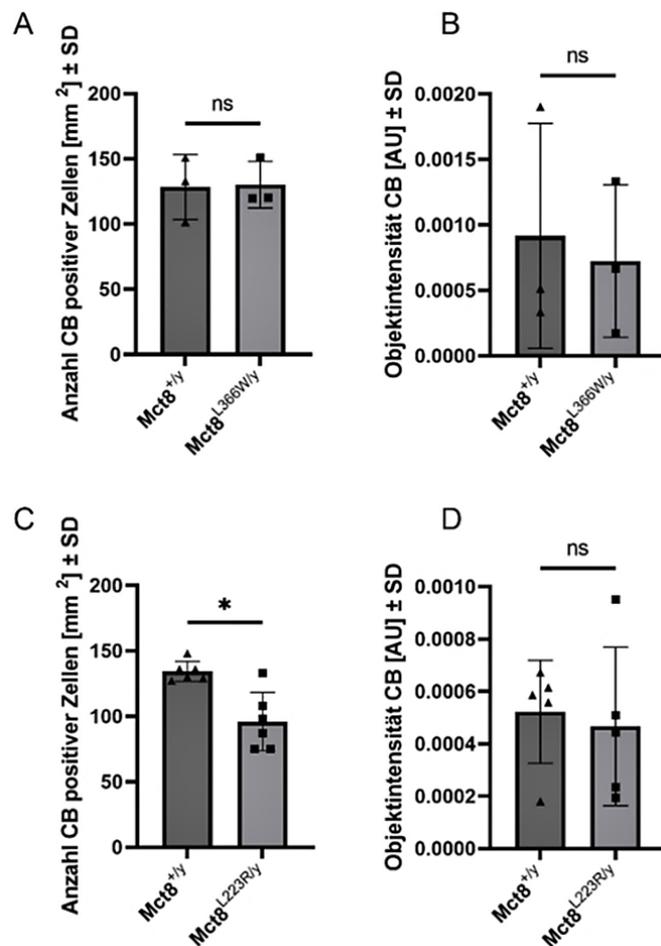


Abbildung 40: Zellzahl und Fluoreszenzintensität CB-positiver Zellen im primären somatosensorischen-Kortex 1 von $Mct8^{+/y}$, $Mct8^{L366W/y}$ und $Mct8^{L223R/y}$ Mäusen. $Mct8^{L366W/y}$ Mausmutanten zeigen eine wildtypische Zellzahl (A) und Fluoreszenzintensität (B) PV-positiver Zellen in der S1-Region. $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutanten zeigen hingegen eine signifikante Reduktion hinsichtlich der Zellzahl CB-positiver Zellen im Vergleich zu $Mct8^{+/y}$ Mäusen (C). Es besteht kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der CB-Fluoreszenzintensität im Vergleich zu $Mct8^{+/y}$ Mäusen (D). Statistik: Ungepaarter-nicht-parametrischer-Mann-Whitney-Test ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$. Folgende Abkürzungen werden verwendet: CB; Calbindin, SD; Standardabweichung, ns; nicht signifikant.

Im Weiteren wird die Myelinintensität der Mausmutanten innerhalb des Corpus Callosum bestimmt (Abb. 41). Sowohl $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutanten, als auch $Mct8^{L366W/y}$ Mäuse zeigen keine Veränderung hinsichtlich der Myelinintensität im Vergleich zu $Mct8^{+/y}$ Mäusen (Abb. 42; Abb. 43). Die hier dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass in beiden Mausmutanten eine physiologische und wildtypische Entwicklung von Myelinisierungsprozessen stattfindet (Abb. 42; Abb. 43). Die $Mct8^{L223R/y}$ Mutation beeinflusst somit nicht die Myelinisierung im Corpus Callosum, jedoch selektiv

Zellpopulationen in der S1-Region des Gehirns. Somit könnte eine intakte hemisphärische Signalweiterleitung im Gehirn, ohne schwerwiegende kognitive sowie motorische Beeinträchtigungen, bestehen. Die $Mct8^{L366W/y}$ Mutation zeigt neben einer physiologischen Myelinisierung auch eine physiologische Zellzahl von PV und CB Zellpopulationen in der S1-Region des Gehirns, weshalb $Mct8^{L366W/y}$ Tiere einen milderen Phänotyp im Vergleich zu $Mct8^{L223R/y}$ Mäusen haben könnten.

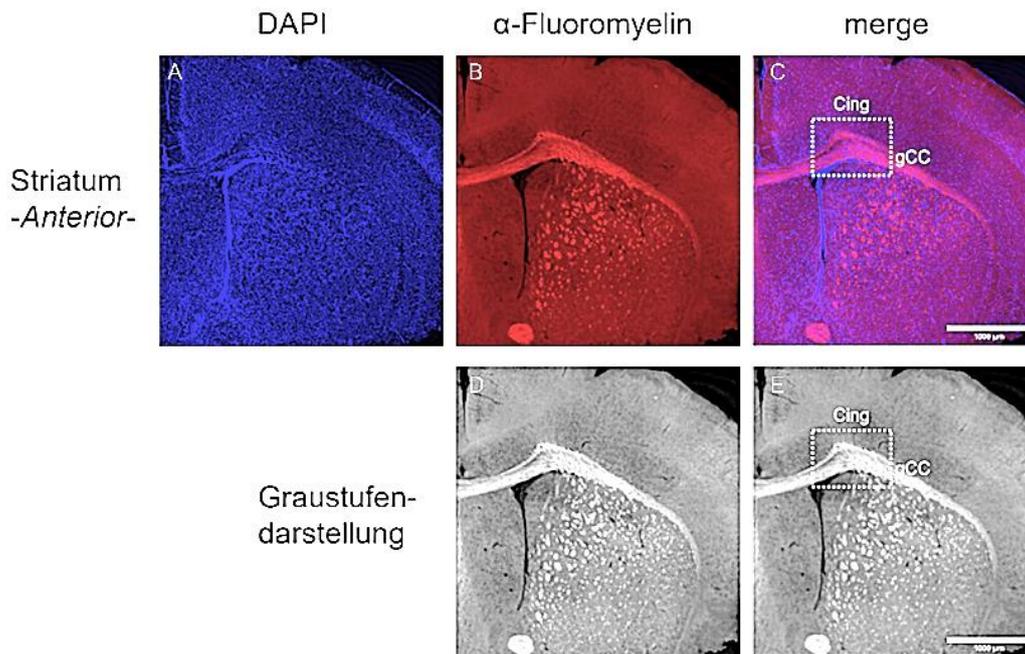


Abbildung 41: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von Gehirnschnitten mit markiertem Cingulum bundle (weißes Rechteck) innerhalb des Corpus Callosum. Die hier dargestellten Bilder zeigen repräsentative anteriore Regionen, welche zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität und Zellzählung verwendet werden. Aus der Abbildung gehen DAPI-gefärbte Zellen (A), sowie eine Myelinfärbung mittels Fluoromyelin hervor (B). Weiterhin werden die Fluoreszenzkanäle kombiniert und überlagert dargestellt (C). Aus der Abbildung geht zudem eine Graustufendarstellung der region of interest (ROI) (weißes Rechteck) hervor (D, E). Die hier dargestellten Bilder zeigen repräsentative Regionen (weißes Rechteck), welche zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität von Myelin mittels Fluoromyelin verwendet werden. Folgende Abkürzungen werden verwendet: Ssp; primärer-somatosensorischer Kortex, BFD; Barrel-Feld, FM; Fluoromyelin, DAPI; 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), ROI; region of interest. Maßstab: 1000 µm.

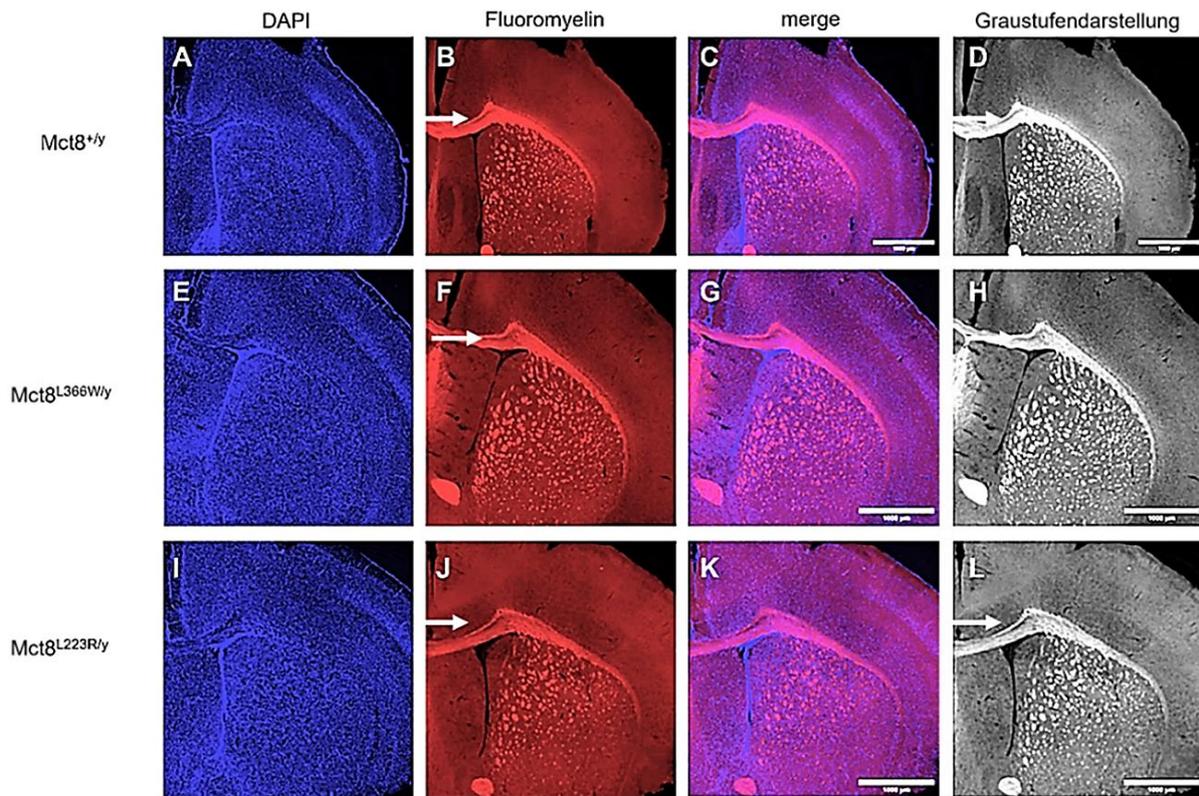


Abbildung 42: Myelinintensität im Cingulum bundle innerhalb des Corpus Callosum in *Mct8^{+/y}*, *Mct8^{L366W/y}* und *Mct8^{L223R/y}* Mäusen. Optisch besteht kein Unterschied hinsichtlich DAPI-gefärbter Zellen zwischen *Mct8^{+/y}* (A), *Mct8^{L366W/y}* (E) und *Mct8^{L223R/y}* (I) Mäusen. *Mct8^{+/y}* Mäuse zeigen eine physiologische Myelinintensität (B). Es besteht keine visuelle Veränderung hinsichtlich der Myelinintensität zwischen *Mct8^{+/y}* (B) und *Mct8^{L366W/y}* (F), sowie *Mct8^{L223R/y}* (J) Tieren. Weiterhin werden die Fluoreszenzkanäle kombiniert und überlagert dargestellt (C, G, K). Aus der Graustufendarstellung ist ebenfalls kein optisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Fluoreszenzintensität von Myelin in *Mct8^{+/y}* (D), *Mct8^{L366W/y}* (H) und *Mct8^{L223R/y}* (L) Mäusen ersichtlich. Folgende Abkürzungen werden verwendet: DAPI; 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), ROI; region of interest. Maßstab: 1000 µm.

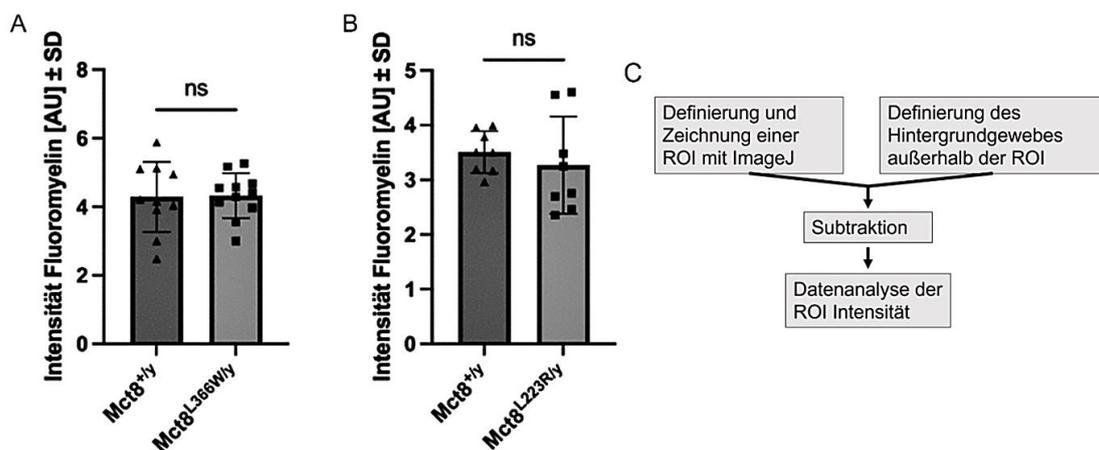


Abbildung 43: Intensität von Myelin innerhalb des Cingulum bundle im Corpus Callosum von $Mct8^{+/y}$, $Mct8^{L366W/y}$ und $Mct8^{L223R/y}$ Mäusen. Es besteht kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Myelinintensität im Cingulum bundle zwischen $Mct8^{+/y}$ und $Mct8^{L366W/y}$ Mausmutanten (A). $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutanten zeigen eine wildtypische Myelinintensität sodass kein signifikanter Unterschied zu $Mct8^{+/y}$ Tieren besteht (B). Zur Quantifizierung wird das Cingulum bundle im Corpus Callosum als region of interest (ROI) definiert, sowie die Hintergrundfluoreszenz des Gewebeschnitts bestimmt (D). Nachfolgend erfolgt eine Subtraktion der Werte sowie Quantifizierung der Daten (D). Statistik: nicht-parametrischer-Mann-Whitney-Test ns $p > 0,05$. Folgende Abkürzungen werden verwendet: FM; Fluoromyelin, SD; Standardabweichung, ns; nicht signifikant.

Aufgrund des potenziell schwereren neurologischen Phänotyp in $Mct8^{L223R/y}$ Mäusen wird im Weiteren die Zellzahl von neuronalen Nucleus (NeuN) -positiven Zellen und dessen Fluoreszenzintensität in $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutanten bestimmt (Abb. 44). NeuN ermöglicht die Detektion von Zellkernen in reifen sowie differenzierten Neuronen. NeuN wird nicht in Neuroblasten, Vorläuferzellen oder Purkinje-Zellen exprimiert. $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutanten zeigen eine wildtypische Verteilung von NeuN-positiven Zellen in der S1-Region des Gehirns (Abb. 44). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Population reifer Neuronen unverändert ist und die Mutation nur in Bezug auf spezifische Zelltypen und spezifische Entwicklungsstadien prädominant sein könnte.

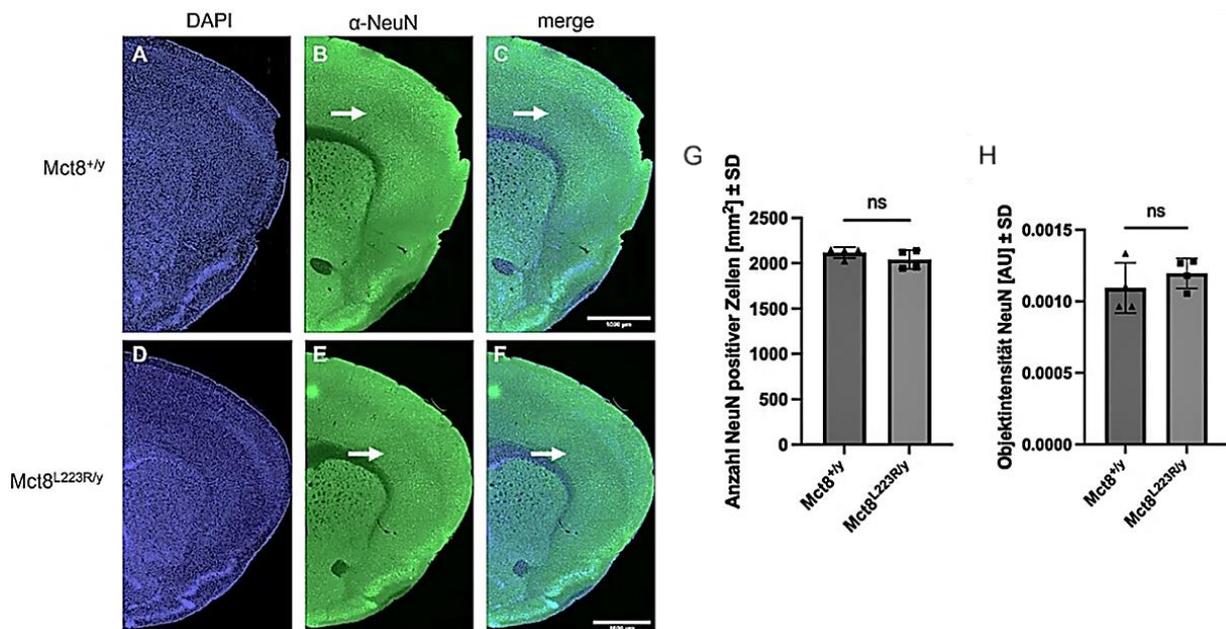


Abbildung 44: Zellzahl und Fluoreszenzintensität NeuN-positiver Zellen im primärensomatosensorischen-Kortex 1 von $Mct8^{+/y}$ und $Mct8^{L223R/y}$ Mäusen. Optisch besteht kein Unterschied hinsichtlich DAPI-gefärbter Zellen zwischen $Mct8^{+/y}$ (A) und $Mct8^{L223R/y}$ (D)

Mäusen. $Mct8^{+/y}$ Mäuse zeigen eine visuell physiologische Zellzahl NeuN-positiver Zellen (B). $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutanten weisen optisch eine wildtypische Zellzahl NeuN-positiver Zellen auf (E). Visuell besteht keine Veränderung in Bezug auf die Fluoreszenzintensität zwischen $Mct8^{+/y}$ und $Mct8^{L223R/y}$ Mäusen (B, E). Weiterhin werden die Fluoreszenzkanäle kombiniert und überlagert dargestellt (C, F). Aus der statistischen Auswertung ergibt sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zellzahl NeuN-positiver Zellen (G), sowie der Fluoreszenzintensität von NeuN-positiven Zellen (H) zwischen $Mct8^{L223R/y}$ und $Mct8^{+/y}$ Mäusen. Statistik: Ungepaarter-nicht-parametrischer-Mann-Whitney-Test ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$. Folgende Abkürzungen werden verwendet: NeuN; neuronaler Nukleus, SD; Standardabweichung, ns; nicht signifikant.

3.2.3 $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutanten zeigen eine verringerte *Mct8* und *Aldh1a1* Expression im Gehirn, sowie eine erhöhte *Dio1*-Expression in der Leber und Niere

Überdies besteht ein weiteres Ziel in der Genexpressionsanalyse von *Mct8*, *Dio1*, *Dio2* und *Aldh1a1* in verschiedenen Organen von $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutanten, zu welchen Herz, Leber, Niere, Gehirn, Hippocampus und Cerebellum gehören. Eine Genexpressionsanalyse erfolgt mit $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutanten, da diese im Vergleich zu $Mct8^{L366W/y}$ Mäusen eine signifikante Histopathologie zeigen.

Im weiteren Verlauf erfolgt eine Genexpressionsanalyse von *Mct8*, *Dio2* und *Aldh1a1* im Gehirn von $Mct8^{+/y}$ und $Mct8^{L223R/y}$ Mäusen. Zudem werden Expressionsanalysen von *Mct8*, *Dio2* und *Dio1* in der Leber, Herz und Niere hinzugezogen, um die Eignung der hier vorliegenden Mausmodelle umfänglich zu beurteilen. In diesem Kontext wird eine Isolation des gesamten Kortex, als auch spezifischer Regionen, zu welchen das Cerebellum und der Hippocampus gehören, vorgenommen. Aus der qPCR Analyse ergibt sich eine signifikante Reduktion in Bezug auf die *Mct8*-Genexpression im Cerebellum von $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutanten im Vergleich zu $Mct8^{+/y}$ Mäusen (Abb. 45). Innerhalb des Cerebrums besteht zudem eine signifikante Verringerung der *Aldh1a1* Expression in $Mct8^{L223R/y}$ Mausmutanten (Abb. 46).

Weiterhin erfolgt zur Kontrolle eine Expressionsanalyse von *Mct8* und *Dio1* im Herz, Leber und Niere der hier dargestellten Tiere. Es können keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der *Mct8*-Genexpression im Herz, Leber und Niere von $Mct8^{L223R/y}$ Mäusen im Vergleich zum WT gefunden werden. Mittels qPCR ist eine signifikante Erhöhung der hepatischen und nephrotischen *Dio1*-Expression ersichtlich (Abb. 47), wohingegen keine

signifikanten Unterschiede hinsichtlich der kardiologischen *Dio1*-Genexpression im Vergleich zu *Mct8*^{+/*y*} Mäusen vorhanden sind (Abb. 47).

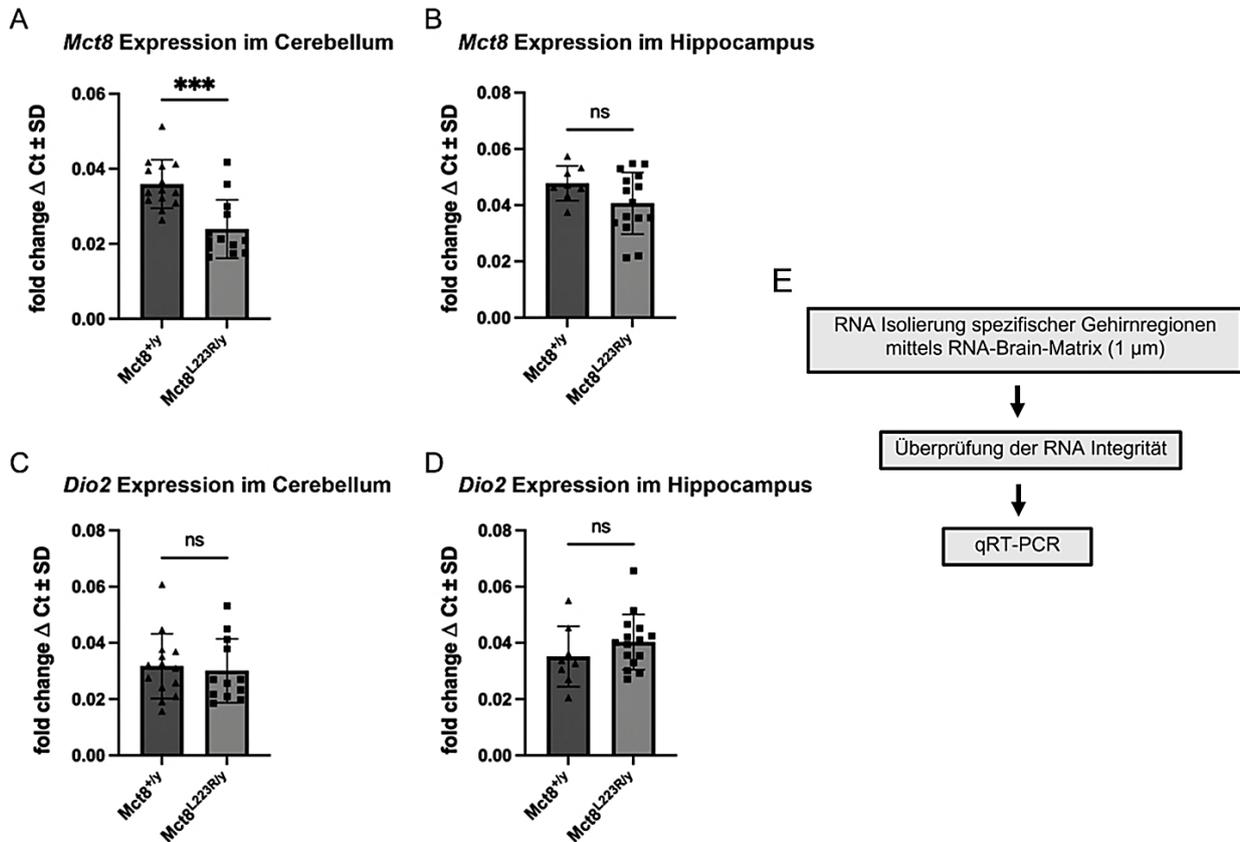


Abbildung 45: Quantitative Echtzeit-PCR zur Analyse der *Mct8*- und *Dio2*-Genexpression im Hippocampus und Cerebellum von 4-Wochen alten *Mct8*^{+/*y*} und *Mct8*^{L223R/y} Tieren. Die relative Genexpression wird mittels der Δ Ct-Methode berechnet und als Fold Change dargestellt. Hierbei fungiert *18s*-RNA als housekeeping Gen. *Mct8*^{L223R/y} Mäuse zeigen eine signifikante Reduktion hinsichtlich der *Mct8*-Expression im Vergleich zu *Mct8*^{+/*y*} Mäuse (A), während eine wildtypische *Mct8*-Expression im Hippocampus von *Mct8*^{L223R/y} Mausmutanten ersichtlich ist (B). Aus der Abbildung geht zudem keine veränderte Genexpression in Bezug auf die *Dio2*-Expression im Cerebellum von *Mct8*^{L223R/y} Mausmutanten im Vergleich zu *Mct8*^{+/*y*} hervor (C). Zudem besteht kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der *Dio2*-Genexpression im Hippocampus von *Mct8*^{L223R/y} und *Mct8*^{+/*y*} Mäusen (D). Die Datenauswertung erfolgt zunächst durch die Isolierung von RNA aus dem Cerebellum und dem Hippocampus (E). Bei bestehender RNA-Integrität kann eine qPCR vorgenommen werden (E). Statistik: Ungepaarter-nicht-parametrischer-Mann-Whitney-Test ns $p > 0,05$, *** $p < 0,001$. Folgende Abkürzungen werden verwendet: *Mct8*; Monocarboxylat-Transporter 8, *Dio2*; Dejodinase-2, SD: Standardabweichung. ns; nicht signifikant.

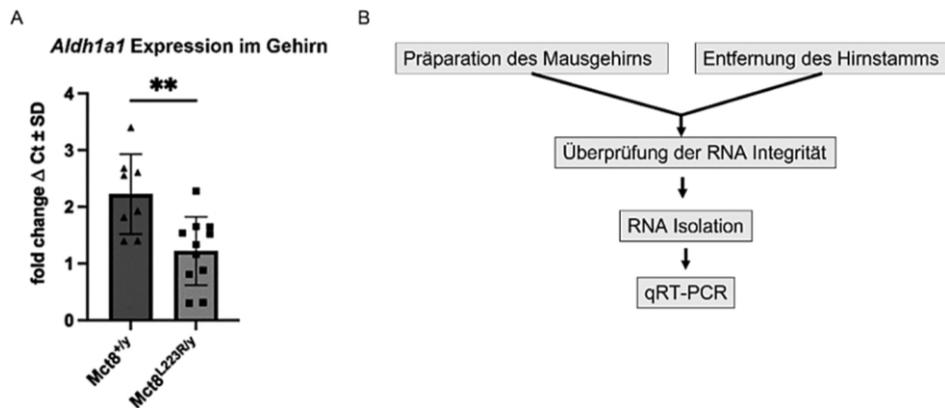


Abbildung 46: Quantitative Echtzeit-PCR zur Analyse der *Aldh1a1*-Genexpression im Cerebrum von 4-Wochen alten *Mct8*^{+/y} und *Mct8*^{L223R/y} Tieren. Die relative Genexpression wird mittels der ΔCt -Methode berechnet und als Fold Change dargestellt. Hierbei fungiert *18s*-RNA als housekeeping Gen. *Mct8*^{L223R/y} Mäuse zeigen eine signifikante Reduktion hinsichtlich der *Aldh1a1*-Expression im Vergleich zu *Mct8*^{+/y} Mäusen (A). Die Datenauswertung erfolgt zunächst durch die Isolierung von RNA aus dem Cerebrum, von welchem der Hirnstamm zuvor entfernt wird (B). Bei bestehender RNA-Integrität kann eine qPCR vorgenommen werden (B). Statistik: Ungepaarter-nicht-parametrischer-Mann-Whitney-Test ns $p > 0,05$, ** $p < 0,01$. Folgende Abkürzungen werden verwendet: *Mct8*; Monocarboxylat-Transporter 8, SD: Standardabweichung. ns; nicht signifikant.

Es erfolgt eine Genexpressionsanalyse mittels qPCR in *Mct8*^{L223R/y} Mäusen, da diese einen potenziell schwachen neurologischen Phänotyp haben könnten. Die vorliegenden qPCR Daten hinsichtlich der Expression von *Mct8*, *Dio1* und *Dio2* zeigen ein verändertes Expressionsmuster von *Mct8*^{L223R/y} Mausmutanten im Vergleich zu *Mct8*^{+/y} Mäusen (Abb. 47). *Mct8*^{L223R/y} Mäuse zeigen eine Reduktion von *Mct8* im Cerebellum, jedoch nicht im gesamten Kortex (Abb. 47). Somit bestehen regionale Unterschiede hinsichtlich der *Mct8*-Expression im Gehirn. Zudem besteht eine globale Reduktion hinsichtlich der *Aldh1a1*-Expression in *Mct8*^{L223R/y} Mausmutanten. *Aldh1a1* ist für die Neurogenese, sowie Glutamatstoffwechsel und den Abbau von toxischen Aldehyden essenziell. Eine Reduktion von *Aldh1a1* führt zu einer Beeinträchtigung der Metabolisierung von Metaboliten, als auch der Zellregeneration und Differenzierung. Daraus resultierend ergeben sich neurologische und zelluläre Dysfunktionen. T3-abhängige Gene beeinflussen die Aktivität und den Stoffwechsel von Neuronen. Infolge eines T3-Mangels im Gehirn wird die Expression T3-abhängiger Gene beeinträchtigt.

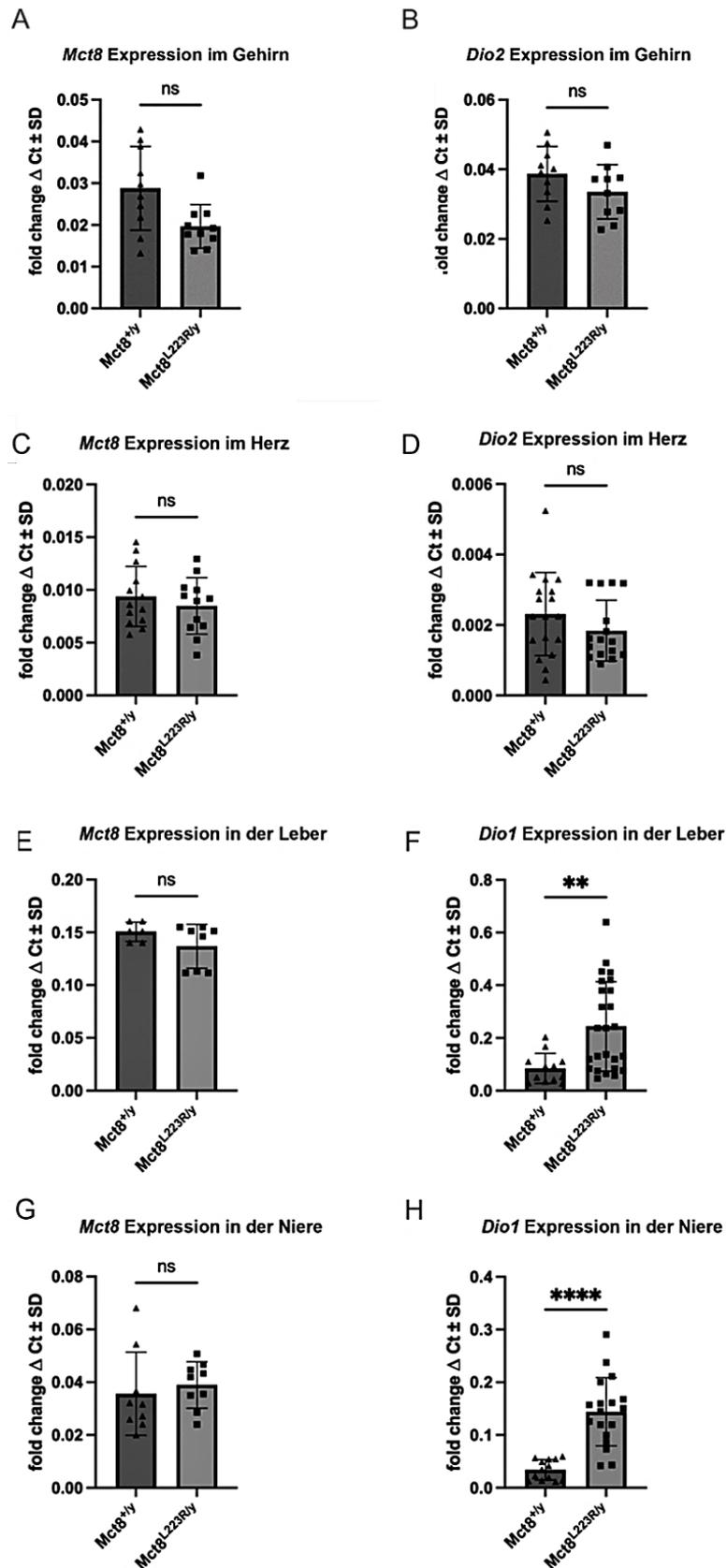


Abbildung 47: Quantitative Echtzeit-PCR zur Analyse der *Mct8*-, *Dio2*- und *Dio1*-Genexpression im Herz, Leber und Niere von *Mct8*^{+/y} und *Mct8*^{L223R/y} Mäusen. Die relative

Genexpression wird mittels der Δ Ct-Methode berechnet und als Fold Change dargestellt. Hierbei fungiert *18s*-RNA als housekeeping Gen. Aus der qPCR Analyse im Cerebrum geht keine signifikante Reduktion hinsichtlich der *Mct8*-Expression in *Mct8*^{L223R/y} Mausmutanten im Vergleich zu *Mct8*^{+y} Mäusen hervor (A). Zudem besteht keine signifikante Reduktion hinsichtlich der *Dio2*-Genexpression (B). Es ist eine wildtypische *Mct8*-Genexpression im Herzen von *Mct8*^{L223R/y} Mausmutanten ersichtlich (C). Überdies besteht eine wildtypische *Dio2*-Genexpression von *Mct8*^{L223R/y} Mausmutanten (D). Innerhalb der Leber besteht kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der *Mct8*-Genexpression zwischen *Mct8*^{L223R/y} und *Mct8*^{+y} Mäusen (E). Im Vergleich zu *Mct8*^{+y} Tieren weisen *Mct8*^{L223R/y} Mausmutanten eine signifikant erhöhte *Dio1*-Expression in der Leber auf (F). Zudem besteht eine wildtypische renale *Mct8*-Genexpression in *Mct8*^{L223R/y} Mausmutanten (G). Im Vergleich zu *Mct8*^{+y} Mäusen ist eine signifikante Erhöhung der renalen *Dio1*-Expression in *Mct8*^{L223R/y} Mäusen ersichtlich (H). Statistik: Ungepaarter-nicht-parametrischer-Mann-Whitney-Test ns $p > 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$. Folgende Abkürzungen werden verwendet: *Mct8*; Monocarboxylat-Transporter 8, *Dio1*/*Dio2*; Dejodinase-1/ Dejodinase-2, SD: Standardabweichung. ns; nicht signifikant.

Die Analyse der Genexpression der isolierten Organe Leber, Niere und Herz von 28-Tagen alten *Mct8*^{L223R/y} Tieren fungiert als Kontrolle sowie zur Bestätigung der Validität des Mausmodells. Hierbei erfolgt eine Analyse der Genexpression von *Mct8*, *Dio1* und *Dio2*. Sowohl in der Leber als auch in der Niere zeigen *Mct8*^{L223R/y} Mäuse eine erhöhte *Dio1*-Expression. Die erhöhte *Dio1*-Expression ist auf eine beeinträchtigte negative Rückkopplung zurückzuführen. *Dio1* ist insbesondere für die Umwandlung von T4 in T3 in der Leber und Niere von *Mct8*^{+y} und *Mct8*^{L223R/y} Mäusen essenziell. Folglich kommt es zu einer T3-Akkumulation und einer damit einhergehenden Beeinträchtigung der Organe.

3.2.4 *Mct8*^{P253L/y}; *Oatp1c1*^{-/-} Mäuse zeigen eine signifikante Gewichtsreduktion im Vergleich zu *Mct8*^{+y} Mäusen

Es erfolgt eine Untersuchung dahingehend, ob zwischen den Mausmutanten Unterschiede hinsichtlich der biometrischen Parameter bestehen. Ein fortlaufendes Ziel ist die Analyse des vorhandenen *Mct8*^{P253L/y}; *Oatp1c1*^{-/-} Mausmodells als repräsentatives Mausmodell zur Untersuchung der korrespondierenden *MCT8*^{P321L/y} Mutation in Patienten. Des Weiteren werden 9-Wochen alte *Mct8*^{+y}, *Mct8*^{P253L/y} und *Mct8*^{P253L/y}; *Oatp1c1*^{-/-} Mäuse charakterisiert. *Mct8*^{P253L/y} weisen keine Unterschiede hinsichtlich der Körperlänge im Vergleich zu *Mct8*^{+y} Mäusen auf (n=3). Es besteht eine signifikante

Reduktion hinsichtlich der Körperlänge von $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu $Mct8^{+/y}$ Tieren, aufgrund der geringen Standardabweichung. $Mct8^{P253L/y}$ Tiere zeigen eine Gewichtsreduktion, diese ist in $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen signifikant (Abb. 48).

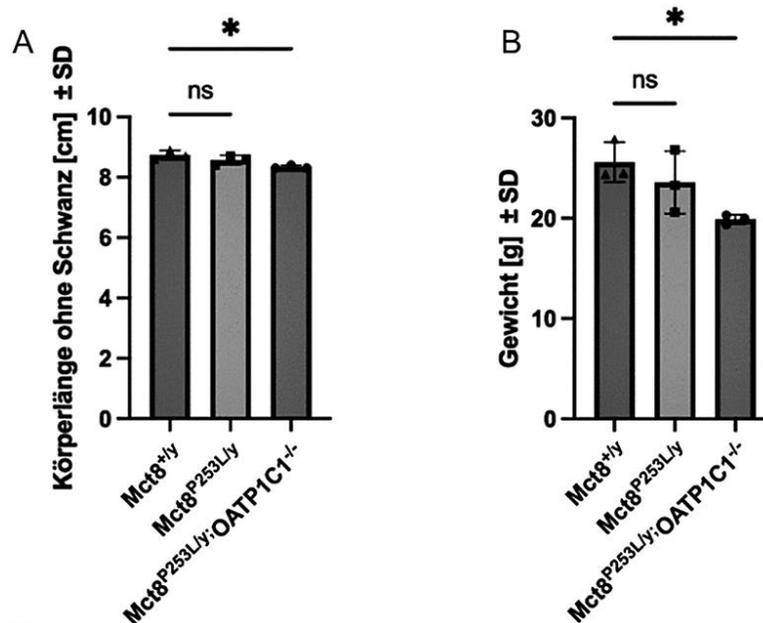


Abbildung 48: Körperlänge und Körpergewicht von $Mct8^{+/y}$, $Mct8^{P253L/y}$ und $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen. 9-Wochen alte $Mct8^{+/y}$ (n=3) Mäuse haben ohne kaudal Fortsatz eine durchschnittliche Körperlänge von 9 cm ± SD (A). Es besteht kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Körperlänge zwischen $Mct8^{+/y}$ und $Mct8^{P253L/y}$ (n=3) Mäusen (A). $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ (n=3) Mäuse weisen eine signifikante Reduktion hinsichtlich der Körperlänge im Vergleich zu $Mct8^{P253L/y}$ und $Mct8^{+/y}$ Tieren auf (A). $Mct8^{P253L/y}$ Mausmutanten weisen mit durchschnittlich 23 g ± SD ein wildtypisches Körpergewicht auf (B). Es ist eine signifikante Gewichtsreduktion in $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mausmutanten im Vergleich zu $Mct8^{+/y}$ Mäusen ersichtlich (B). $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäuse haben ein durchschnittliches Körpergewicht von 20 g ± SD, während gesunde $Mct8^{+/y}$ Mäuse ein durchschnittliches Körpergewicht von 25 g ± SD vorweisen (B). Statistik: Ungepaarter-nicht-parametrischer-Mann-Whitney-Test ns p>0,05, * p<0,05. Folgende Abkürzungen werden verwendet: SD; Standardabweichung, ns; nicht signifikant.

Aus der Analyse der Körperlänge zwischen $Mct8^{+/y}$, $Mct8^{P253L/y}$ und $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen ergeben sich keine starken Unterschiede. $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäuse zeigen eine signifikante Reduktion hinsichtlich des Körpergewichts. Dies deutet darauf hin, dass eine $Oatp1c1$ -Defizienz ($Oatp1c1^{-/-}$) in Mäusen mit einem schwerwiegenderen Phänotyp einhergehen kann. $Oatp1c1$ ist ein Transportprotein, mittels welchem T4 durch die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn transportiert werden kann. Im Gehirn kann T4 in T3 umgewandelt werden. Mutationen im $Mct8$ -Transportprotein führen zu einem beeinträchtigten Transport von T3 in das Gehirn. Das $Oatp1c1$ -Transportprotein kann einen T3-Mangel im Gehirn durch den Transport von T4 in Mäusen kompensieren. Mäuse besitzen im Vergleich zum Menschen mehr *SLCO1C1*/ $Oatp1c1$ -Transportproteine. Mausmutanten ohne zuzügliche $Oatp1c1$ -Defizienz sind folglich als repräsentatives Mausmodell limitiert. Um die Repräsentativität des Mausmodells zu erhöhen, wäre eine zuzügliche $Oatp1c1$ -Defizienz in $Mct8^{L366W/y}$ und $Mct8^{L223R/y}$ Mäusen denkbar. Dafür spricht auch die deutliche Gewichtsreduktion in $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu $Mct8^{P253L/y}$ Mäusen. Die signifikante Gewichtsreduktion weist auf eine starke metabolische, molekulare und physiologische Veränderung im Fettstoffwechsel der Mäuse hin.

3.2.5 $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäuse zeigen eine signifikante Reduktion von Parvalbumin, Myelin und dem Perinneuronalen Netz, während Calretinin erhöht ist

Im Weiteren wird eine histologische Charakterisierung von $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mausmutanten hinsichtlich der Zellzahl und Fluoreszenzintensität (Objektintensität) von Parvalbumin (PV)- und Calretinin (CR) -positiven Zellen im Barrel-Feld des primären somatosensorischen-Kortex 1 (S1BF) erfolgen. Zudem wird die Myelinintensität im Cingulum des Corpus Callosum und das perineuronale Netz (PNN) in der S1BF-Region charakterisiert. Ziel ist die histologische Charakterisierung der jeweiligen Mausmutanten, sowie insbesondere die Analyse des PNN und dessen Bedeutung im Kontext eines $Mct8$ / $MCT8$ -Defekts.

Zur immunhistologischen Charakterisierung werden Parvalbumin-, Calretinin- und *Wisteria floribunda* Agglutinin (WFA) -positive Zellen im Barrel-Feld des primären somatosensorischen-Kortex 1 (S1BF) von $Mct8^{P253L/y}$, $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ und $MCT8^{+/y}$

Mäuse quantifiziert. Sowohl $Mct8^{P253L/y}$ als auch $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäuse zeigen eine signifikante Reduktion von PV-positiven Zellen in der S1BF-Region im Vergleich zum WT (Abb. 49; Abb. 50). Zudem ist die Parvalbumin (PV)-Fluoreszenzintensität in $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen signifikant reduziert (Abb. 49, Abb. 50). Überdies ist in $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen eine signifikante Reduktion hinsichtlich der Zellzahl und Fluoreszenzintensität von WFA-positiven Zellen in der S1BF-Region ersichtlich (Abb. 49, Abb. 50). Um den Zusammenhang zwischen beiden Variablen in Mausmutanten mit Punktmutation im Mct8-Transportprotein zu untersuchen, wird eine lineare Korrelationsanalyse durchgeführt. Hierbei geht ein positiver linearer Zusammenhang hinsichtlich der Zellzahl und Fluoreszenzintensität von PV- und WFA-positiven Zellen hervor (Abb. 50).

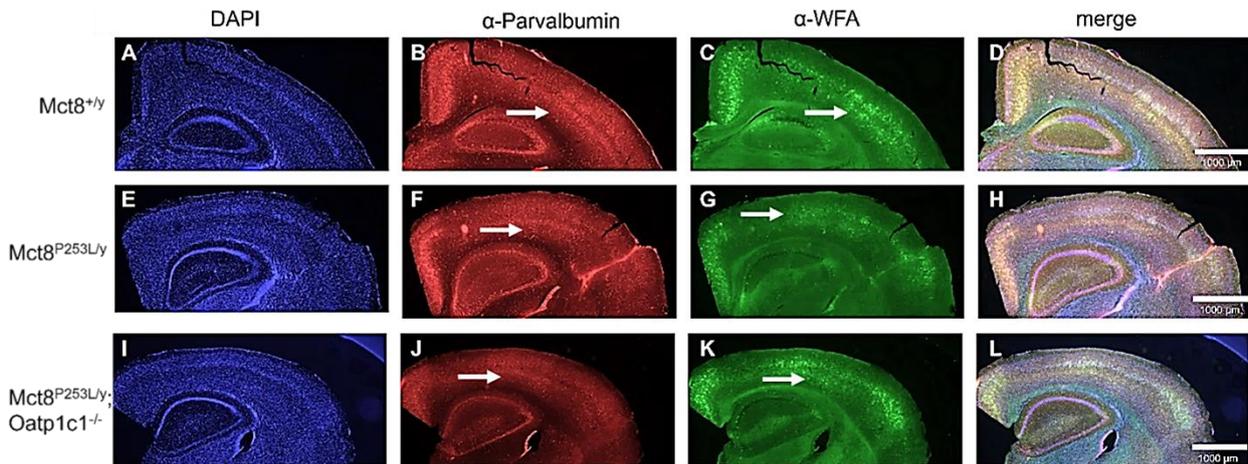


Abbildung 49: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung von DAPI-gefärbten Zellen, sowie WFA- und PV-positiven Zellen in der S1BF-Region von $Mct8^{+/y}$, $Mct8^{P253L/y}$ und $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen. Bei den hier vorliegenden Gewebeschnitten des Gehirns handelt es sich um Gefrierschnitte. Visuell ist kein Unterschied hinsichtlich der Zellzahl DAPI-gefärbter Zellen zwischen $Mct8^{+/y}$, $Mct8^{P253L/y}$ und $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen ersichtlich (A, E, I). Optisch besteht eine Reduktion hinsichtlich der Zellzahl PV-positiver Zellen in $Mct8^{P253L/y}$ Mausmutanten im Vergleich zu $Mct8^{+/y}$ Mäusen (B, F). $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mausmutanten weisen eine visuelle signifikante Reduktion hinsichtlich der Zellzahl PV-positiver Zellen auf (J). Zudem ist eine reduzierte Fluoreszenzintensität von PV-positiven Zellen in $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen ersichtlich (J), wohingegen eine wildtypische Fluoreszenzintensität in $Mct8^{P253L/y}$ Mäusen hervorgeht (B, F). Aus der Abbildung geht eine physiologische Verteilung der Zellzahl WFA-positiver Zellen in $Mct8^{+/y}$ Mäusen hervor (C). Optisch besteht keine Verringerung hinsichtlich der Zellzahl WFA-positiver Zellen in $Mct8^{P253L/y}$ Mausmutanten (G), jedoch in der S1BF-Region von $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Tieren (K). Visuell besteht eine reduzierte Fluoreszenzintensität WFA-positiver Zellen in $Mct8^{P253L/y}$ und $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen (G, K). Weiterinn werden die Fluoreszenzkanäle kombiniert und überlagert

dargestellt (D, H, L). Folgende Abkürzungen werden verwendet: PV; Parvalbumin, WFA; *Wisteria floribunda* Agglutinin, DAPI; 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI). Maßstab: 1000 μm .

Aus den hier dargestellten Ergebnissen geht eine Reduktion hinsichtlich der Zellzahl PV-positiver Zellen in $\text{Mct8}^{\text{P253L/y}}$ Mausmutanten hervor, welche optisch in $\text{Mct8}^{\text{P253L/y};\text{Oatp1c1}^{-/-}}$ Mäusen schwerwiegender erscheint. Zudem besteht eine signifikante Reduktion hinsichtlich der PV-Fluoreszenzintensität in $\text{Mct8}^{\text{P253L/y};\text{Oatp1c1}^{-/-}}$ Tieren. Letztere haben somit einen potenziell schwerwiegenderen neurologischen Phänotyp infolge einer zuzüglichen *Oatp1c1*-Defizienz ($\text{Oatp1c1}^{-/-}$), weshalb das hier dargestellte Mausmodell repräsentativ für die korrespondierende humane $\text{MCT8}^{\text{P321L/y}}$ Mausmutante ist. $\text{Mct8}^{\text{P253L/y};\text{Oatp1c1}^{-/-}}$ Mäuse könnten somit einen signifikanten neurologischen Phänotyp haben. Zwischen PV-positiven Zellen und WFA-positiven Zellen besteht zudem eine Korrelation (Abb. 50). Mittels WFA können Bestandteile des PNN detektiert werden. Letzteres umgibt vorwiegend PV-positive Zellen. Bei einem T3-Mangel im Gehirn ist die Zellzahl PV- und WFA-positiver Zellen reduziert. PV-positive Zellen reagieren sensitiv auf einen T3-Mangel des Gehirns, wohingegen das PNN insgesamt weniger stark beeinträchtigt wird.

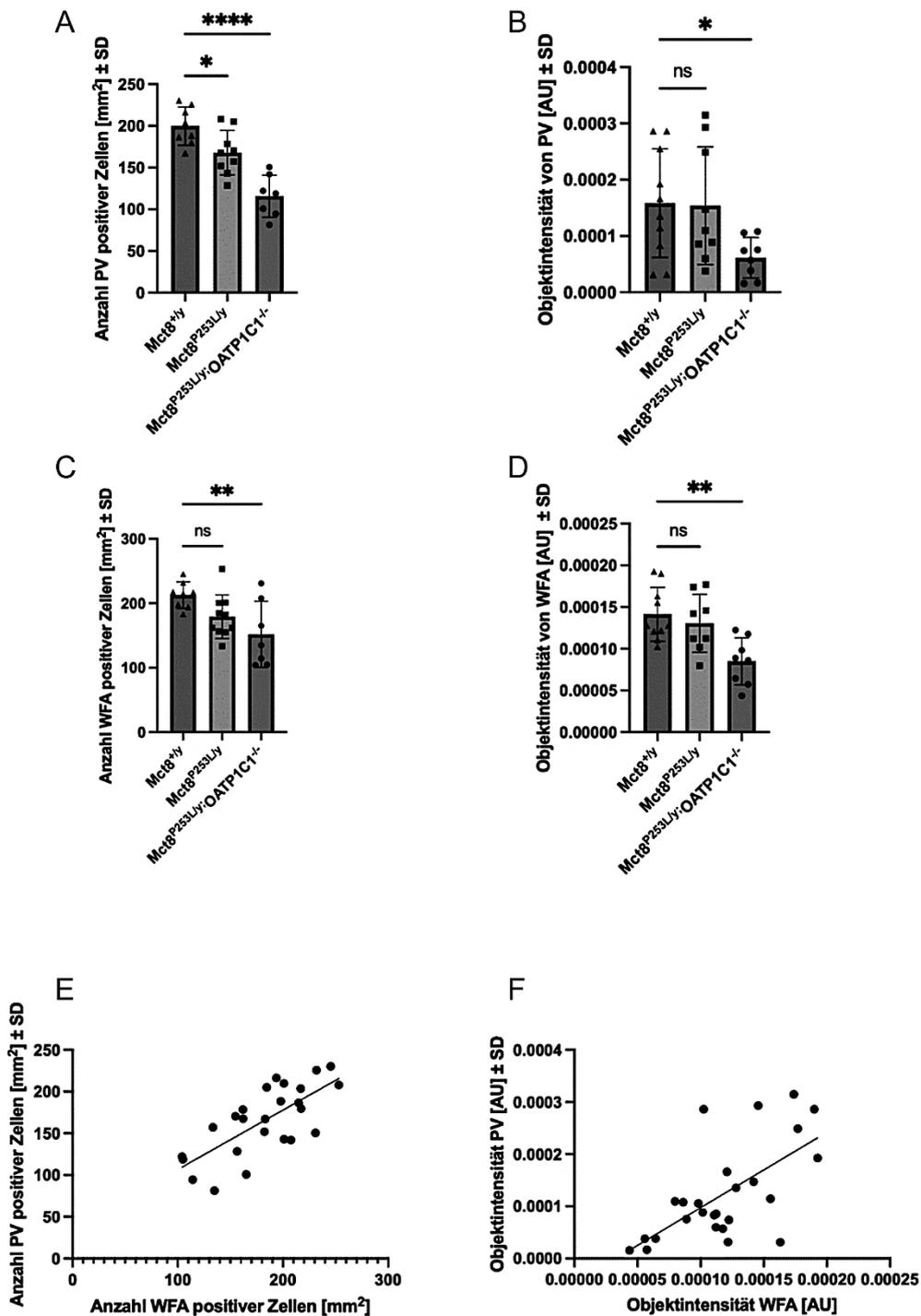


Abbildung 50: Zellzahl und Fluoreszenzintensität von WFA- und PV-positiven Zellen im Barrel-Feld des primären-somatosensorischen-Kortex 1 (S1BF) von Mct8^{+/y}, Mct8^{P253L/y} und Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-} Mäusen. Sowohl Mct8^{P253L/y} als auch Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-} Mäuse weisen eine signifikante Reduktion hinsichtlich der Zellzahl PV-positiver Zellen im Vergleich zu Mct8^{+/y} Tieren auf (A). Im Vergleich zu Mct8^{+/y} Mäusen ist die Zellzahl PV-positiver Zellen in der S1BF-Region von Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-} Mäusen um ca. 40 % reduziert (A). Darüber hinaus zeigen Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-} Tiere eine signifikante Reduktion in Bezug auf die PV-Fluoreszenzintensität (B). Es besteht kein signifikanter

Unterschied hinsichtlich der PV-Fluoreszenzintensität zwischen $Mct8^{+/y}$ und $Mct8^{P253L/y}$ Mäusen (B). $Mct8^{+/y}$ Mäuse weisen eine physiologische Zellzahl WFA-positiver Zellen auf (C). Es ist keine signifikante Reduktion hinsichtlich der Zellzahl WFA-positiver Zellen in $Mct8^{P253L/y}$ Mausmutanten ersichtlich (C). In $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen besteht eine signifikante Reduktion hinsichtlich der Zellzahl WFA-positiver Zellen (C). Zudem besteht kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der WFA-Fluoreszenzintensität von $Mct8^{+/y}$ und $Mct8^{P253L/y}$ Mäusen, während $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Tiere eine signifikante Reduktion in Bezug auf die WFA-Fluoreszenzintensität in der S1BF-Region zeigen (D). Aus der Abbildung geht ein linearer Zusammenhang zwischen der Zellzahl PV-positiver Zellen und WFA-positiver Zellen hervor ($R^2=0,5196$, $m = 0,7121$) (E). Überdies besteht eine lineare Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität von PV- und WFA-positiven Zellen ($R^2=0,4147$, $m = 1,446$) (F). Statistik: ungepaarte-parametrische-one-way-ANOVA unter Annahme einer Gauß-Verteilung ns $p>0,05$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, **** $p<0,0001$. Folgende Abkürzungen werden verwendet: SD; Standardabweichung, PV; Parvalbumin, WFA; *Wisteria floribunda* Agglutinin, ns; nicht signifikant.

Im Weiteren wird die Zellzahl und Fluoreszenzintensität CR-positiver Zellen bestimmt. Aus den hier gezeigten Resultaten ist eine signifikante Erhöhung der Zellzahl CR-positiver Zellen in der S1BF-Region von $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen ersichtlich (Abb. 51; Abb. 52). Die CR-Fluoreszenzintensität ist hierbei im Vergleich zu $Mct8^{+/y}$ Mäusen unverändert (Abb. 51; Abb. 52). $Mct8^{P253L/y}$ Mäuse zeigen eine geringfügige, jedoch nicht signifikante Erhöhung der CR-Zellzahl und Fluoreszenzintensität (Abb. 51; Abb. 52). CR ist ein Kalziumbindendes-Protein, welches an der Kalziumhomöostase beteiligt ist und zudem essenziell für die physiologische Signalweiterleitung. CR besitzt somit eine Schutzfunktion. Noch ist unklar, welche Bedeutung Calretinin bei einer bestehenden MCT8-Defizienz ($MCT8^{-/-}$) einnimmt. Die signifikante Erhöhung hinsichtlich der Zellzahl CR-positiver Zellen kann jedoch ein Kompensationsmechanismus infolge einer veränderten Kalziumhomöostase aufgrund eines Mct8-Defekts sein.

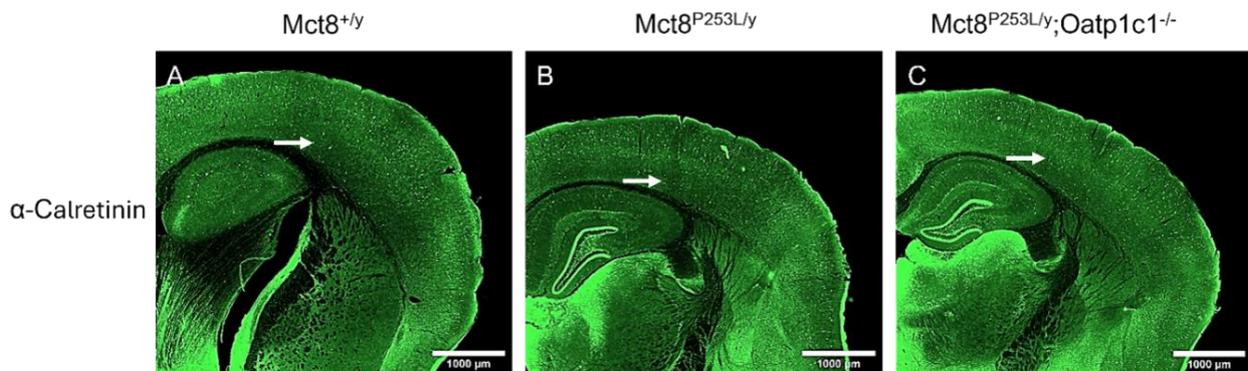


Abbildung 51: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung von CR-positiven Zellen in der S1BF-Region von $Mct8^{+/y}$, $Mct8^{P253L/y}$ und $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen. Bei den hier vorliegenden Gewebeschnitten des Gehirns handelt es sich um Gefrierschnitte. Visuell weisen $Mct8^{+/y}$ Mäuse eine physiologische Verteilung CR-positiver Zellen auf (A). Es ist kein Unterschied hinsichtlich der Zellzahl CR-positiver Zellen zwischen $Mct8^{+/y}$ (A) und $Mct8^{P253L/y}$ Mäusen (B) ersichtlich, während in $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mausmutanten (C) eine erhöhte Zellzahl CR-positiver Zellen in der S1BF-Region ersichtlich ist. Visuell besteht kein Unterschied in Bezug auf die CR-Fluoreszenzintensität von $Mct8^{+/y}$ (A), $Mct8^{P253L/y}$ (B) und $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen (C). Folgende Abkürzungen werden verwendet: CR; Calretinin. Maßstab: 1000 μm .

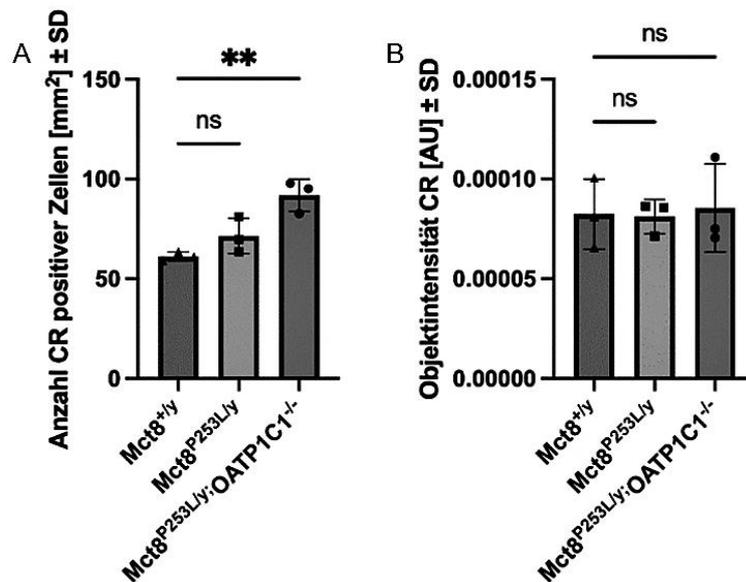


Abbildung 52: Zellzahl und Fluoreszenzintensität CR-positiver Zellen in der S1BF-Region von $Mct8^{+/y}$, $Mct8^{P253L/y}$ und $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen. Die $Mct8^{P253L/y}$ Mausmutante zeigt eine wildtypische Verteilung von CR-positiven Zellen in der S1BF-Region (A), wohingegen $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäuse eine signifikante Erhöhung hinsichtlich der Zellzahl CR-positiver Zellen vorweisen (A). Es besteht keine signifikante Veränderung hinsichtlich der CR-Fluoreszenzintensität zwischen $Mct8^{+/y}$, $Mct8^{P253L/y}$ und $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen (B). Statistik: ungepaarte-parametrische-one-way-ANOVA unter Annahme einer Gauß-Verteilung ns $p>0,05$, ** $p<0,01$. Folgende Abkürzungen werden verwendet: CR; Calretinin, SD; Standardabweichung, ns; nicht signifikant.

Aus der Messung der Myelinintensität mittels Fluoromyelin im Corpus Callosum geht eine Reduktion in $Mct8^{P253L/y}$ Mausmutanten hervor, während eine signifikante Verringerung in $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen besteht (Abb. 53). $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Tiere können somit signifikante Beeinträchtigungen von Myelinisierungsprozessen sowie der Signalweiterleitung innerhalb des Gehirns aufweisen. Dies kann mit schwerwiegenden kognitiven Veränderungen, sowie einer beeinträchtigten Koordination zwischen den Gehirnhemisphären einhergehen.

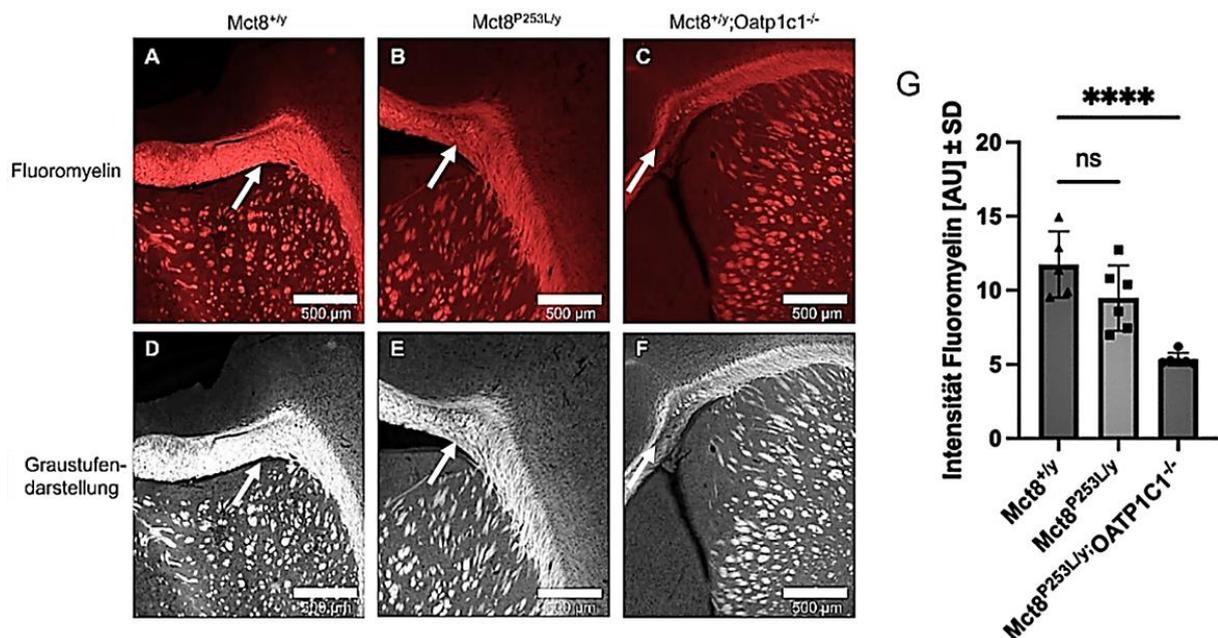


Abbildung 53: Myelinintensität im Cingulum bundle innerhalb des Corpus Callosum in $Mct8^{+/y}$ und $Mct8^{P253L/y}$ und $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen. $Mct8^{+/y}$ Mäuse zeigen eine physiologische Myelinintensität (A). Visuell ist eine Verringerung hinsichtlich der Intensität von Myelin in $Mct8^{P253L/y}$ Mäusen ersichtlich (B), welche jedoch insbesondere in $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Tieren ersichtlich wird (C). Aus der Graustufendarstellung ist ebenfalls eine physiologische Fluoreszenzintensität von Myelin in $Mct8^{+/y}$ Mäusen (D) ersichtlich, sowie eine geringe Reduktion in $Mct8^{P253L/y}$ Mausmutanten (E). $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäuse zeigen eine signifikante Reduktion hinsichtlich der Fluoreszenzintensität von Myelin (F). Aus der statistischen Auswertung ergibt sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Fluoreszenzintensität von Myelin zwischen $Mct8^{+/y}$ und $Mct8^{P253L/y}$ Mäusen (G). Aus Abbildung geht eine signifikante Reduktion der Fluoreszenzintensität von Myelin innerhalb des Cingulum bundle im Corpus Callosum von $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen hervor (G). Statistik: ungepaarte-parametrische-one-way-ANOVA unter Annahme einer Gauß-Verteilung ns $p > 0,05$; **** $p < 0,0001$. Folgende Abkürzungen werden verwendet: DAPI; 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), ROI; region of interest. Maßstab: 1000 μ m.

4 Diskussion

4.1 Identifikation und Validierung von *SLC29A2/ENT2* und *SLC22A9/OAT7* als ¹²⁵I-TRIAC-Transporter mit Optimierung der Transportaktivität

SLC29A2/ENT2 kodiert für den äquilibrierenden Equilibrative-Nukleosid-Transporter 2 (ENT2) und wird in multiplen Zelltypen und Organen zu welchen die Leber, Herz, Gehirn, Hypophyse, Speicheldrüse, Schilddrüse, Striatum, Hippocampus, Diencephalon, Astrozyten, Neuronen und die Blut-Hirn-Schranke gehören, exprimiert (Alanko et al., 2006; Hasel et al., 2017; Mangravite et al., 2003; Naes et al., 2020b). *SLC29A2/ENT2* ist ein Transporter für Purin- und Pyrimidin-Nukleobasen, sowie weiterer Medikamente zu welchen Zidovudin, Zalcitabin, Didanosin, Rivabirin, Cytarabin, Gemcitabin, Fludarabin, Cladribin, Clofarabin, Trifluridin, 5-fluorouracil, und 50-deoxy-5-fluorouridin (5'dFUR) gehören (Naes et al., 2020a). In der hier vorliegenden Arbeit wird zudem gezeigt, dass *SLC29A2/ENT2* ein ¹²⁵I-TRIAC-Transportprotein ist. Letzteres kann über strukturelle Ähnlichkeiten der Substrate und dessen chemische Eigenschaften begründet werden. *SLC29A2/ENT2* besitzt somit aufgrund der ubiquitär lokalisierten Expression ein therapeutisches Potenzial für die Behandlung von Patienten mit MCT8-Defizienz (MCT8^{-/-}). Die ubiquitäre Expression im Gehirn deutet darauf hin, dass *SLC29A2/ENT2* essenziell bei der Verteilung von TRIAC im Gehirn sein könnte. Aufgrund dessen, dass TRIAC zudem einen positiven Effekt auf Patienten mit AHDS besitzt, ist anzunehmen, dass es neben *SLC29A2/ENT2* weitere multiple und nicht spezifische TRIAC-Transporter geben kann (TRIAC-Trial I and II: NCT02060474, NCT02396459). Bisher bestehen in der Literatur keine Nachweise, dass es sich bei *SLC29A2/ENT2*, um ein Transportprotein von Schilddrüsenhormonen wie I-T3, I-rT3 und I-T4 handelt (Naes et al., 2020a). Die Ergebnisse legen jedoch nahe, dass *SLC29A2/ENT2* als Transportprotein für Schilddrüsenhormon-Analoga und Derivate fungieren kann, was auf eine bisher noch unbekannte Transportfähigkeit dieses Proteins zurückzuführen ist. Der Transport von ¹²⁵I-TRIAC erweitert das bisherige Substratspektrum des Transporters und deutet darauf hin, dass nicht nur Nukleoside, sondern auch strukturell ähnliche Schilddrüsenhormon-Derivate transportiert werden können. In diesem Kontext haben kürzliche Studien weitere Transportproteine mit einem Screening identifiziert (Chen et al., 2024). Hierbei wurde die

Expression ausgewählter TRIAC-Kandidatengene durch Biotinylierung an der Zelloberfläche von COS-1 Zellen bestimmt. Anschließend wurde die Expression der TRIAC-Kandidatengene mittels fluoreszierender in-situ-Hybridisierung in Hirnschnitten von Wildtyp- und *Mct8;Oatp1c1*-defizienten (*Mct8*^{-/-};*Oatp1c1*^{-/-}) Mäusen bestimmt (Chen et al., 2024). Hierbei zeigen *SLCO1B1/OATP1B1*, *SLC22A8/OAT3*, *SLC10A1/NTCP*, *SLC22A6/OAT1* und *SLC22A24* eine signifikante intrazelluläre Anreicherung von TRIAC, während *SLC22A8/OAT3* die höchste mRNA-Expression in kapillaren Endothelzellen von Mausgehirnen zeigt (Chen et al., 2024). Die Ergebnisse dieser Studie legen ergänzend zu dem hier identifizierten *SLC29A2/ENT2*-Transportprotein nahe, dass innerhalb des Gehirns und der Blut-Hirn-Schranke multiple Transporter lokalisiert sind, welche als schwache Transporter von Schilddrüsenhormon-Derivaten fungieren können und durch welche TRIAC in das Gehirn gelangen kann.

SLC22A9/OAT7 kodiert für den organischen Anionentransporter-Polypeptid 7 (OAT7) und wird in Neuronen, jedoch insbesondere in Hepatozyten exprimiert. Die *SLC22*-Transportfamilie ist für dessen Fähigkeit, verschiedene Medikamente transportieren zu können, bekannt und umfasst zudem Transporter, die Schilddrüsenhormon-Derivaten transportieren können (Chen et al., 2024). Zu den Substraten, welche von *SLC22A9/OAT7* transportiert werden können, gehören konjugierte Steroide, Pravastatin, kurzkettige Fettsäuren wie Propionat, Butyrat und Valerat, sowie organische Anionen mit sulfatierten Gruppen (Holzer et al., 2017; Shin et al., 2007; Ward et al., 2000). Zudem zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse, dass es sich bei *SLC22A9/OAT7* um einen ¹²⁵I-TRIAC-Transporter handelt (Becker & Güth-Steffens et al., 2024). Dies kann darüber begründet werden, dass ¹²⁵I-TRIAC bei physiologischem pH-Wert (7,4) eine deprotonierte Carbonsäuregruppe besitzt und somit ein Carboxylat-Anion ist. Im Vergleich zum ubiquitär lokalisierten *SLC29A2/ENT2* Transportprotein ist *SLC22A9/OAT7* hauptsächlich in der Peripherie lokalisiert (Holzer et al., 2017; Shin et al., 2007; Ward et al., 2000). Im Vergleich zu den bisher identifizierten ¹²⁵I-TRIAC-Transportern *SLCO1B1/OATP1B1*, *SLC22A8/OAT3*, *SLC10A1/NTCP*, *SLC22A6/OAT1*, *SLC22A24* und *SLC29A2/ENT2* besitzt *SLC22A9/OAT7* eine geringe Substratspezifität. *SLC22A9/OAT7* besitzt somit ein hohes klinisches Potenzial, da *SLC22A9/OAT7* zudem ein schwacher ¹²⁵I-TETRAC-Transporter ist. Zudem kann die ¹²⁵I-TRIAC-Aufnahme in *SLC22A9/OAT7*-Überexpressionsklonen durch Zugabe von nicht-radioaktivem DITPA und Sobetirome

kompetitiert werden, weshalb *SLC22A9/OAT7* ebenfalls ein DITPA- und Sobetirome-Transporter ist. Die Ergebnisse zeigen, dass es sich bei *SLC22A9/OAT7* um einen wichtigen Transporter mit klinischer Relevanz bei der Aufnahme von Jodthyronin-Analoga und Derivaten handelt. Die hier dargestellten Ergebnisse erweitern das Verständnis hinsichtlich der Transportmechanismen für Schilddrüsenhormon-Derivate und zeigen, dass sowohl *SLC29A2/ENT2*, als auch *SLC22A9/OAT7* zum Transport von Schilddrüsenhormon-Derivaten und dessen Verteilung im Gehirn beitragen können (Becker & Güth-Steffens et al., 2024).

Zudem ist erwähnenswert, dass alle hier genannten ¹²⁵I-TRIAC-Transporter vorwiegend innerhalb der Peripherie exprimiert werden, wohingegen nur *SLC22A8/OAT3* und *SLC29A2/ENT2* hinreichend im Gehirn exprimiert werden (Becker & Güth-Steffens et al., 2024; Chen et al., 2024; Nigam, 2018). *SLC22A8/OAT3* wird hauptsächlich in der Niere exprimiert (Chen et al., 2024; Nigam, 2018). *SLC22A6/OAT1* transportiert ähnliche Substrate wie *SLC22A8/OAT3* und besitzt als organischer Anionentransporter eine ähnliche Substratspezifität wie *SLC22A8/OAT3* (Chen et al., 2024). Die Ergebnisse zu den identifizierten ¹²⁵I-TRIAC-Transportern könnten mit vorangegangenen klinischen Untersuchungen in Patienten korrelieren (TRIAC-Trial I and II: NCT02060474, NCT02396459). Die klinische Studie zeigte, dass weiterhin kognitive Beeinträchtigungen vorhanden sind, während die periphere T3-Akkumulation reduziert wird (TRIAC-Trial I and II: NCT02060474, NCT02396459). Dies könnte über das vermehrte Vorhandensein potenzieller TRIAC-Transporter in der Peripherie begründet werden, während es eine limitierte Anzahl von TRIAC-Transportern gibt, welche im Gehirn und Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke exprimiert werden.

Bisher ist unklar, ob die in einer vorherigen Studie identifizierten *SLCO1B1/OATP1B1*-, *SLC22A8/OAT3*-, *SLC10A1/NTCP*-, *SLC22A24* und *SLC22A6/OAT1*-Transportproteine ebenfalls ¹²⁵I-TETRAC-, ¹²⁵I-Sobetirome- und ¹²⁵I-DITPA-Transporter sind (Chen et al., 2024). In diesem Kontext sind weitere Untersuchungen notwendig, jedoch könnte die Transportfähigkeit von *SLC22A8/OAT3* und *SLC22A6/OAT1* für ¹²⁵I-TRIAC nahelegen, dass diese gleichsam dem *SLC22A9/OAT7*-Transporter auch Jodthyronin-Analoga und Derivate transportieren könnten. *SLC22A8/OAT3* und *SLC22A6/OAT1* sind wie *SLC22A9/OAT7* organische Anionentransporter (Nigam, 2018). Zudem ist Estron-3-Sulfat ein Substrat von *SLC22A8/OAT3* und *SLC22A9/OAT7*. Dies weist auf potenzielle

Ähnlichkeiten hinsichtlich der transportierbaren Substrate hin und könnte darauf hindeuten, dass *SLC22A8/OAT3* ebenfalls ein ^{125}I -TETRAC-, ^{125}I -Sobetirome- und ^{125}I -DITPA-Transporter sein könnte. Insbesondere ^{125}I -DITPA könnte aufgrund der zwei Jodatome und sterisch geringeren Größe eher von *SLC22A8/OAT3* und *SLC22A6/OAT1* transportiert werden als ^{125}I -TETRAC. *SLC22A8/OAT3*, *SLC29A2/ENT2* und *SLC22A9/OAT7* könnten aufgrund deren Expressionsmuster in verschiedenen Organen bei der Behandlung eines MCT8-Defekts von Wichtigkeit sein. *SLC22*-Transporter werden zudem häufig mit dem Transport von Arzneimitteln assoziiert (Nigam, 2018).

4.1.1 Fazit zur Charakterisierung der TRIAC-Transporter

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass *SLC29A2/ENT2* und *SLC22A9/OAT7* ^{125}I -TRIAC-Transporter sind (Abb. 54). *SLC22A9/OAT7* ist zudem ein schwacher ^{125}I -TETRAC-Transporter (Abb. 54). Zudem kann die ^{125}I -TRIAC-Aufnahme in *SLC22A9/OAT7*-Überexpressionsklonen durch Zugabe von nicht-radioaktivem DITPA und Sobetirome kompetitiert werden, was darauf hindeutet, dass *SLC22A9/OAT7* ebenfalls ein DITPA- und Sobetirome-Transporter ist. Die Ergebnisse zeigen, dass es sich bei *SLC22A9/OAT7* um einen wichtigen Transporter mit klinischer Relevanz bei der Aufnahme von Jodthyronin-Analoga und Derivate handelt.

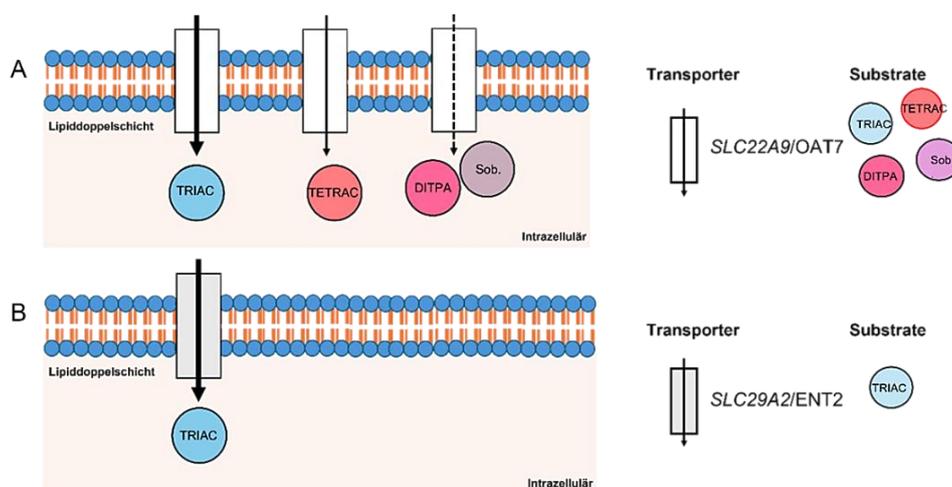


Abbildung 54: Schematische Darstellung von *SLC29A2/ENT2* und *SLC22A9/OAT7* und transportierbarer Substrate. *SLC22A9/OAT7* ist ein ^{125}I -TRIAC, sowie schwacher ^{125}I -TETRAC-Transporter (A). Zudem ist *SLC22A9/OAT7* ein schwacher DITPA- und

Sobetirome-Transporter (A). *SLC29A2/ENT2* ist ein ^{125}I -TRIAC-Transporter (B). Eigene Darstellung.

4.1.2 Ausblick zur Charakterisierung der TRIAC-Transporter

Zukünftige Studien könnten weitere Untersuchungen an dem hier genannten *SLC29A2/ENT2*- und *SLC22A9/OAT7*-Transportprotein vornehmen. Die weitere Untersuchung von *SLC29A2/ENT2* und *SLC22A9/OAT7* könnte Aufschluss über die molekularen Transportmechanismen geben, sowie dessen Bedeutung im Kontext des MCT8-Defekts. Es könnten Untersuchungen dahin gehend erfolgen, wo genau die Transporter im Gehirn wirken. Eine solche Analyse kann aufzeigen, ob es regionale Unterschiede in der Aufnahme des Medikaments gibt. Im Gehirn könnten unterschiedliche Expressionsmuster der TRIAC-Transporter vorhanden sein. Zellen ohne TRIAC-Transporter bleiben dann unempfindlich. Das Wissen über die beteiligten TRIAC-Transporter und die zellulären und entwicklungsbedingten Expressionsmuster könnten dazu beitragen, die erzielte Wirkung der TRIAC-Behandlung besser zu verstehen, wodurch es möglich ist, die TRIAC-Behandlungsparadigmen zu optimieren (TRIAC-Trial I and II: NCT02060474, NCT02396459). Das Wissen darüber bietet essenzielle Erkenntnisse für die Grundlagenforschung sowie bei potenziellen Wirkstoffinteraktionen mit anderen Medikamenten. Zudem können weitere molekulare Erkenntnisse zur Wirkweise von DITPA und Sobetirome erlangt werden, welche darüber hinaus potenziell auch zur Behandlung von anderen Erkrankungen eingesetzt werden könnten.

4.2 Merkmale von Mausmodellen des Allan-Herndon-Dudley-Syndroms

Zur Untersuchung des MCT8-Defekts und dessen Behandlungsmöglichkeiten sind geeignete Mausmodelle notwendig. In diesem Kontext zeigten vorangegangene Studien, dass ein Mausmodell mit *Mct8*^{P253L/y} Punktmutation und ohne *Oatp1c1*-Defizienz (*Oatp1c1*^{-/-}) ebenfalls ein geeignetes Mausmodell zur Untersuchung des MCT8-Defekts sein könnte (Valcárcel-Hernández et al., 2022). Die Untersuchung an *Mct8*^{P253L/y} (*hMCT8*^{P321L/y}) Mausmutanten zeigten einen neurologischen Phänotyp (Valcárcel-

Hernández et al., 2022). Dies wurde damit begründet, dass ein vollständiger knock-out des Mct8-Transportproteins in Mäusen zu einer Kompensationsreaktion führt, woraus sich eine Zunahme der Oatp1c1- und Lat2-Expression ergibt, welche folglich die Ausprägung eines neurologischen Phänotyps beeinträchtigt (Valcárcel-Hernández et al., 2022). Nachfolgend werden weitere Mausmutanten untersucht, bei welchen ein potenziell vorhandener neurologischer Phänotyp durch Bestimmung der Zellzahl spezifischer Neuronen charakterisiert wird. Die hierbei charakterisierten Tiere sind Mct8^{+/y}, Mct8^{L223R/y}, Mct8^{L366W/y}, Mct8^{P253L/y} und Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-} Mausmutanten. Hierzu werden zunächst biometrische Daten hinsichtlich des Körpergewichts und der Körperlänge erhoben. Mct8^{L223R/y} und Mct8^{P253L/y} Mäuse zeigen eine Gewichtsreduktion, welche insbesondere in Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-} Mäusen signifikant ist. Die Ergebnisse korrelieren mit vorangegangenen Untersuchungen an Patienten mit MCT8-Defizienz (MCT8^{-/-}), welche ebenfalls eine Reduktion des Körpergewichts im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe zeigten und kann über die geringe Muskelmasse und Fähigkeit zur Nahrungsaufnahme in AHDS-Patienten begründet werden (van Geest et al., 2022). Überdies verweisen vorherige Mct8^{-/-};Oatp1c1^{-/-} Mausmodelle auf den Einfluss von T3 auf den Stoffwechsel. Sowohl das Körpergewicht als auch die Körperfettmasse sind in Mct8^{-/-};Oatp1c1^{-/-} Mäusen im Vergleich zum WT reduziert (Maity-Kumar et al., 2022). Die hier dargestellten Ergebnisse korrelieren somit mit der bestehenden Literatur. In diesem Kontext kann angenommen werden, dass die Reduktion des Körpergewichts von der Schwere der Mutation und deren spezifischen Auswirkungen abhängt.

4.2.1 Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-} Mäuse zeigen den potenziell stärksten neurologischen Phänotyp und eine signifikante Reduktion von WFA als PNN Marker

Parvalbumin (PV), Calbindin (CB) und Calretinin (CR) sind Kalziumbindungsproteine und werden in verschiedenen GABAergen Interneuronenpopulationen exprimiert. Zudem sind diese essenziell für die Kalziumhomöostase (Druga et al., 2023). Eine Veränderung hinsichtlich der Zellzahl und Expression von PV, CB und CR kann zu einer Akkumulation von Kalzium in der Zelle führen und neuronale Prozesse beeinträchtigen. Die hier dargestellten Ergebnisse korrelieren mit einer zuvor erschienenen Untersuchung, bei welcher histologische Untersuchungen in Mct8;Oatp1c1-defizienten (Mct8^{-/-};Oatp1c1^{-/-})

Mäusen erfolgte (Maity-Kumar et al., 2022; Sundaram et al., 2022). $Mct8^{-/-};Oatp1c1^{-/-}$ Mäuse zeigten hierbei eine verringerte Zellzahl von PV-positiven Zellen, sowie eine Erhöhung von CR-positiven Zellen. CR gehört zur EF-Familie, welche strukturell als Bindungsmotiv eine Helix-Schleifen-Helix Struktur zur Bindung von Kalziumionen besitzt (Palczewska et al., 2005; Qi et al., 2021). Zudem ist CR am neuronalen Wachstum, kognitiven Prozessen, Gedächtnisbildung, sowie Differenzierungsprozessen beteiligt und wird bei neuronalen Schäden hochreguliert (Qi et al., 2021). Die in dieser Arbeit gezeigte Erhöhung hinsichtlich der Zellzahl CR-positiver Zellen korreliert somit mit vorangegangenen Untersuchungen in $Mct8;Oatp1c1$ -defizienten ($Mct8^{-/-};Oatp1c1^{-/-}$) Mäusen (Valcárcel-Hernández et al., 2022)

Aus den hier vorliegenden Daten geht zudem eine Reduktion von PV-positiven Zellen in $Mct8^{L223R/y}$ und $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen hervor. Dies korreliert mit vorangegangenen Untersuchungen zu $Mct8^{-/-};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen, welche ebenfalls eine Reduktion von PV-positiven Zellen in der S1-Region zeigen (Maity-Kumar et al., 2022; Sundaram et al., 2022). Eine Verringerung von PV-positiven Zellen korreliert mit einer veränderten Freisetzung des Neurotransmitters GABA, sowie IPSPs, da es sich bei PV-positiven Neuronen um fast-spiking inhibitorische GABAerge Interneuronen handelt (Eggermann & Jonas, 2011; Enwright et al., 2016; Jiang et al., 2016; Kimoto et al., 2014). Eine Reduktion hinsichtlich der Zellzahl PV-positiver Zellen könnte somit zu einer Verringerung von inhibitorischen präsynaptischen Signalen führen und etwaige Entstehungen von Epilepsien begünstigen (Jiang et al., 2016; Qi et al., 2021). Dies korreliert mit den Ergebnissen vorangegangener klinischer Untersuchungen, bei denen auch einige Patienten infolge einer MCT8-Defizienz ($MCT8^{-/-}$) Epilepsien zeigten (Masnada et al., 2022).

$Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäuse weisen eine starke Reduktion von Myelin im Vergleich zu $Mct8^{P253L/y}$ oder gesunden $Mct8^{+/y}$ Mäusen auf. Myelin umgibt die Axone von Neuronen und ist an der elektrischen Isolation sowie der physiologischen Signalweiterleitung im Gehirn beteiligt. Der Corpus Callosum ist die größte Kommissur zwischen beiden Gehirnhälften und ist essenziell für die Signalsynchronisation beider Hemisphären. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäuse gleichsam $Mct8;Oatp1c1$ -defizienten ($Mct8^{-/-};Oatp1c1^{-/-}$) Mäusen eine starke Reduktion von Myelin im Corpus Callosum zeigen (Maity-Kumar et al., 2022; Sundaram et al., 2022).

Dies korreliert mit vorangegangenen klinischen Studien an Patienten (Iwayama et al., 2021). Hierbei ging aus klinischen MRT-Untersuchungen an Patienten mit MCT8-Defizienz eine Reduktion von Myelin im Gehirn hervor (Iwayama et al., 2021). In diesem Kontext wurde eine reduzierte Myelinisierung bei 84 % der Patienten im Alter von ≤ 2 Jahren festgestellt (Vancamp et al., 2020; Matheus et al., 2015; Vancamp et al., 2020). Die Studie inkludierte sowohl den Corpus Callosum als auch die weiße-Substanz des Gehirns (Vancamp et al., 2020; Matheus et al., 2015; Vancamp et al., 2020). Dennoch ist anzumerken, dass bisherige MRT-Untersuchungen zur Myelinisierung in unterschiedlichen Patienten, sowie unterschiedlichen Altersstufen stattfanden. Bestehende individuelle Mutationen von Patienten blieben hierbei unberücksichtigt (Matheus et al., 2015; Vancamp et al., 2020). Zukünftig sind diesbezüglich weitere MRT-Studien an Patienten notwendig.

Aufgrund dessen, dass in $Mct8^{P253L/y}$ Mäusen mit zuzüglicher $Oatp1c1$ -Defizienz ($Oatp1c1^{-/-}$) ebenfalls eine reduziert Myelinisierung ersichtlich ist, könnten diese als repräsentatives Mausmodell zur Untersuchung eines neurologischen Phänotyps im Kontext des perineuronale Netz (PNN) bei einem $Mct8$ -Defekt fungieren (Mayerl et al., 2014). Bisher gibt es keine hinreichenden experimentellen Untersuchungen bezogen auf das PNN in Patienten mit $MCT8^{P321L/y}$ Mutation. Die genauere Untersuchung des PNN ist notwendig, um die Erkrankung der $MCT8$ -Defizienz vollumfänglich verstehen zu können. Aufgrund dessen, dass das PNN bisher nicht inkludiert wurde, ist noch unklar, wie sich das PNN zwischen den verschiedenen Mausmodellen und in dessen Pathologie unterscheidet. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Reduktion des PNN mit dem Schweregrad der Mutation korreliert. Noch gibt es keine expliziten Untersuchungen hinsichtlich des PNN und dessen Reduktion in Patienten mit $MCT8$ -Defizienz, jedoch ist bekannt, dass das PNN insbesondere PV-positive Zellen umgibt und bei Erkrankungen ebenfalls beeinträchtigt sein könnte (Lupori et al., 2023). Auch Patienten mit $MCT8$ -Defizienz weisen neurologische Defizite auf, welche mit einem veränderten PNN in Zusammenhang gebracht werden könnten. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen zudem eine lineare Korrelation zwischen PV-positiven Zellen und WFA-positiven Zellen (Druga et al., 2023; Lemieux et al., 2023; Lipachev et al., 2019; Lupori et al., 2023; Micheva et al., 2021; Tewari et al., 2022). Das PNN ist für die Signalweiterleitung unerlässlich, da dieses synaptische Verbindungen stabilisiert und die synaptische

Plastizität reduziert (Reichelt et al., 2019). Das PNN kodiert gedächtnisrelevante Informationen und deren Aufrechterhaltung, indem die Kumulation konkurrierender Informationen während informationsbezogener Kodierungsprozesse inhibiert werden (Reichelt et al., 2019). Der Verlust des PNNs könnte somit zu einer kognitiven Beeinträchtigung führen. Die Reduktion des PNN in Mäusen könnte mit dem bekannten klinischen Phänotyp von Patienten, welche an AHDS erkrankt sind und ebenfalls eine kognitive Retardierung aufweisen, übereinstimmen. (Masnada et al., 2022). Es ist denkbar, dass Patienten möglicherweise vereinzelt Informationen nicht gerichtet erfassen und kodieren können. Eine erhöhte synaptische Plastizität, sowie eine einhergehende Verringerung von inhibitorischen Signalen durch PV-positive Zellen könnte zu einem pathologischen, sowie affektiven und kognitiven Zustand beitragen, wodurch kumulative Informationen nicht hinreichend selektiert und inhibiert werden (Enwright et al., 2016; Orduz et al., 2013; Reichelt et al., 2019; Testa et al., 2019).

4.2.2 Fazit zu den Merkmalen von Mausmodellen mit Allan-Herndon-Dudley-Syndrom

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass auch Mausmutanten mit einer Punktmutation einen potenziell geringfügigen neurologischen Phänotyp haben könnten, jedoch ist dies von der jeweiligen Mutation und den Auswirkungen auf das Mct8-Transportprotein abhängig. Mct8^{L366W/y} Mäuse haben womöglich keinen neurologischen Phänotyp, während Mct8^{L223R/y} und Mct8^{P253L/y} Mäuse einen äußerst schwachen neurologischen Phänotyp haben könnten. Zudem besteht in Mct8^{L223R/y} Mausmutanten ein verändertes *Mct8*- und *Aldh1a1*-Expressionsmuster. Insbesondere *Aldh1a1* ist in Mct8^{L223R/y} Mäusen signifikant reduziert. Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-} Mausmodelle haben den potenziell schwerwiegenderen neurologischen Phänotyp. Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-} Mäuse zeigen signifikante Veränderungen hinsichtlich der Zellzahl von PV- und WFA-positiven Zellen. Zudem zeigen diese eine reduzierte Myelinintensität und eine erhöhte Zellzahl CR-positiver Zellen. Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-} Mäuse zeigen eine lineare Korrelation in Bezug auf die Zellzahl und Fluoreszenzintensität von PV- und WFA-positiven Zellen.

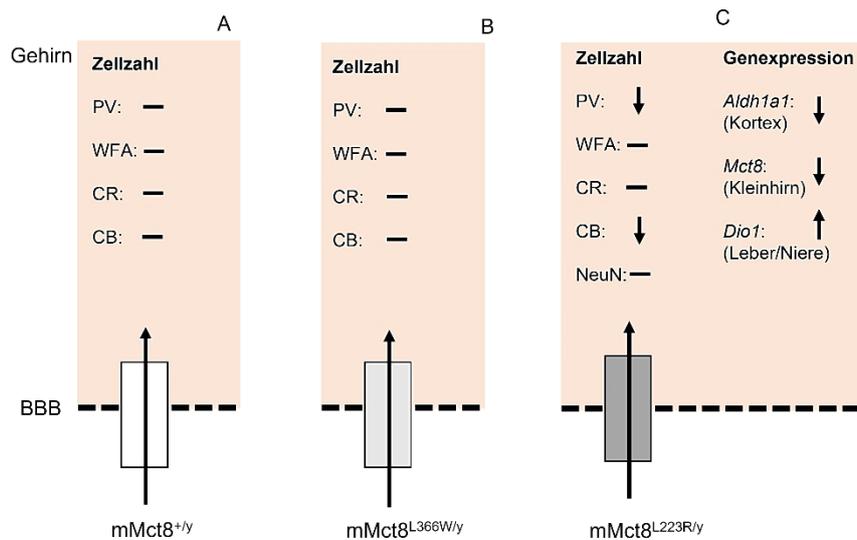


Abbildung 55: Charakterisierung eines möglichen neurologischen Phänotyps in *Mct8*^{L366W/y} und *Mct8*^{L223R/y} Mausmutanten. *Mct8*^{+/y} weisen eine physiologische Zellzahl PV-, WFA-, CR- und CB-positiver Zellen auf (A). *Mct8*^{L366W/y} Mausmutanten zeigen eine wildtypische Zellzahl PV-, WFA-, CR- und CB-positiver Zellen (B). *Mct8*^{L223R/y} Mausmutanten zeigen eine signifikante Reduktion hinsichtlich der Zellzahl PV- und CB-positiver Zellen (C). Es besteht kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zellzahl WFA-, CR- und NeuN-positiver Zellen in *Mct8*^{L223R/y} Mäusen im Vergleich zu *Mct8*^{+/y} Tieren (C). Zudem besteht eine signifikante Reduktion hinsichtlich der *Aldh1a1*-Expression im Kortex von *Mct8*^{L223R/y} Mausmutanten, sowie der *Mct8*-Expression innerhalb des Cerebellum (C). Zudem ist eine erhöhte *Dio1*-Expression in der Leber und Niere von *Mct8*^{L223R/y} Mausmutanten ersichtlich (C). *Mct8*^{L223R/y} Mausmutanten könnten im Vergleich zu *Mct8*^{L366W/y} Mausmutanten einen potenziell schwerwiegenderen neurologischen Phänotyp haben. Folgende Abkürzungen werden verwendet: PV; Parvalbumin, WFA; *Wisteria floribunda* Agglutinin, CR; Calretinin, CB; Calbindin, NeuN; neuronaler Nukleus, *Aldh1a1*; Aldehyddehydrogenase 1 Familie A1, *Dio1*; Dejodase-1; *Mct8*; Monocarboxylat-Transporter 8. Eigene Darstellung.

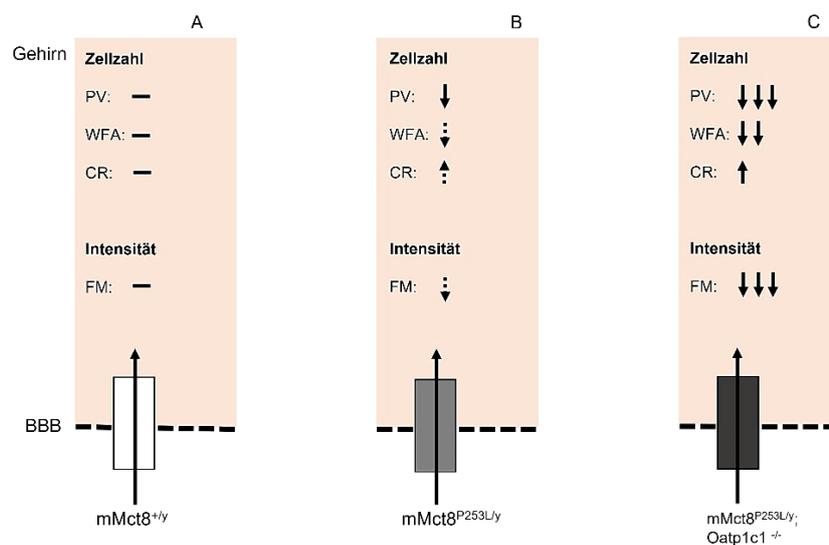


Abbildung 56: Charakterisierung eines möglichen neurologischen Phänotyps in $Mct8^{P253L/y}$ und $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen. $Mct8^{+/y}$ Mäuse weisen eine physiologische Zellzahl PV-, WFA- und CR- positiver Zellen auf (A), $Mct8^{P253L/y}$ Mausmutanten zeigen eine signifikante Reduktion hinsichtlich der Zellzahl PV-positiver Zellen (B). Zudem zeigen $Mct8^{P253L/y}$ Mausmutanten eine geringfügige Reduktion in Bezug auf die Zellzahl WFA-positiver Zellen, während die Zellzahl CR-positiver Zellen geringfügig erhöht ist (B). Im Vergleich zu $Mct8^{+/y}$ Mäusen zeigen $Mct8^{P253L/y}$ Tiere eine veränderte Fluoreszenzintensität von Myelin (B). $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäuse zeigen eine signifikante Reduktion hinsichtlich der Zellzahl PV- und WFA-positiver Zellen (C). Zudem besteht eine erhöhte Zellzahl CR-positiver Zellen (C). Die detektierte Fluoreszenzintensität von Myelin ist zudem in $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen signifikant reduziert (C). $Mct8^{P253L/y}$ Mausmutanten könnten einen potenziell geringfügigen neurologischen Phänotyp haben, wohingegen $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäuse den potenziell schwerwiegendsten neurologischen Phänotypen haben könnten (C). Folgende Abkürzungen werden verwendet: PV; Parvalbumin, WFA; *Wisteria floribunda* Agglutinin, CR; Calretinin, FM; Fluoromyelin. Eigene Darstellung.

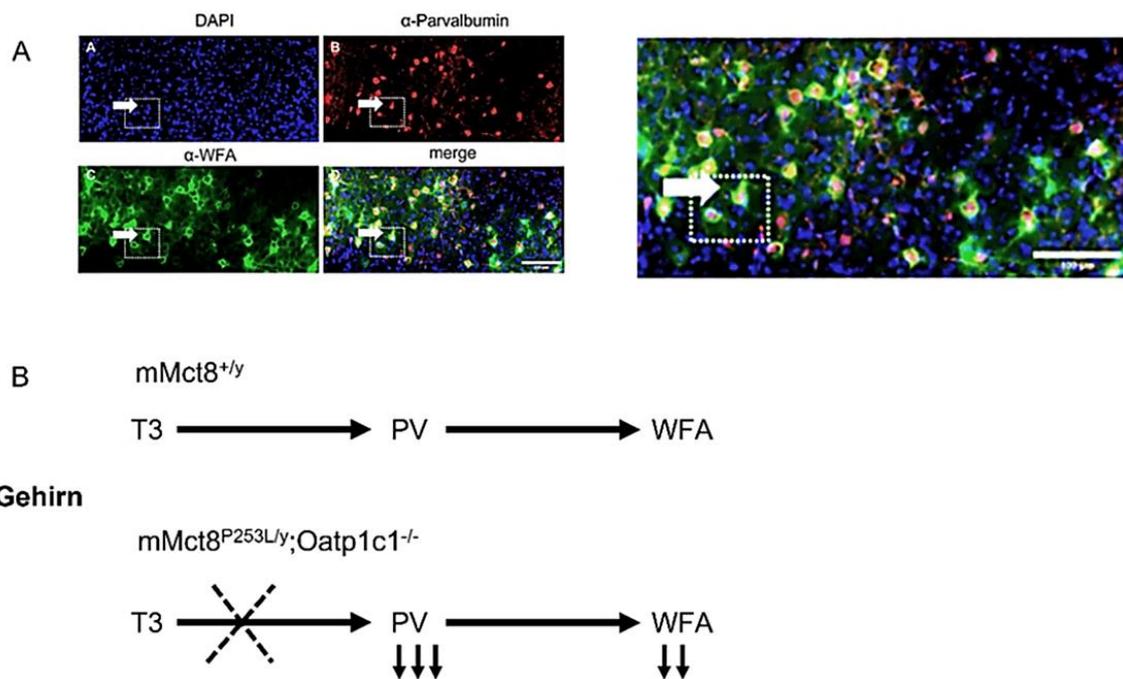


Abbildung 57: Korrelation zwischen PV- und WFA-positiven Zellen, sowie Auswirkungen eines T3-Mangels auf PV- und WFA-positive Zellen. Das PNN umgibt insbesondere PV- positive Zellen (A) (siehe auch Abb. 34). In der Abbildung sind DAPI-gefärbte Zellen, sowie PV- positive Zellen ersichtlich (weißes Quadrat) (A). Zudem geht eine Detektion WFA-positiver Zellen hervor (weißes Quadrat) (A). Aus der überlagerten Darstellung der Fluoreszenzkanäle ist ersichtlich, dass das PNN insbesondere PV- positive Zellen umgibt (A). Bei physiologischen T3-Werten im Gehirn ist die Zellzahl sowie Fluoreszenzintensität von PV- positiven Zellen, sowie WFA- positiven Zellen in $mMct8^{+/y}$ Mäusen unverändert (B). Ein T3-Mangel im Gehirn von $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen korreliert mit einer signifikanten Reduktion PV- positiver Zellen (B). Folglich wird auch die Detektion WFA- positiver Zellen signifikant beeinträchtigt, welche als Marker für das PNN fungieren (B).

PV-positive Zellen zeigen hierbei eine signifikantere Reduktion, während WFA-positive Zellen geringfügiger als PV-positive Zellen durch einen T3-Mangel beeinflusst werden (B). Es besteht eine Korrelation hinsichtlich der Zellzahl und Fluoreszenzintensität zwischen PV-positiven Zellen und WFA-positiven Zellen (B). Folgende Abkürzungen werden verwendet: PV; Parvalbumin, WFA; *Wisteria floribunda* Agglutinin, mMct8; muriner Monocarboxylat-Transporter 8. Maßstab: 100 µm. Eigene Darstellung.

4.2.3 Ausblick zu den Merkmalen von Mausmodellen mit Allan-Herndon-Dudley-Syndrom

Zukünftige Studien könnten weiterhin Untersuchungen zur Korrelation von PV- und WFA-positiven Zellen im Kontext einer MCT8-Defizienz (MCT8^{-/-}) und in Abhängigkeit der entsprechenden Mutationen vornehmen. Noch ist unklar, wie sich ein MCT8-Defekt auf das PNN in Patienten auswirkt, weshalb hierzu die Untersuchung weiterer Mausmodelle notwendig ist. Zudem könnten Mct8^{L366W/y};Oatp1c1^{-/-}, Mct8^{L223R/y};Oatp1c1^{-/-} und Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-} Mäuse als bessere Mausmodelle zur Untersuchung des MCT8-Defekts im Kontext des PNN fungieren. Diesbezüglich sind ebenfalls weitere Analysen notwendig, um die hier untersuchten Mäuse weiter zu charakterisieren. Die weitere Charakterisierung der Punktmutationen und deren Auswirkungen auf die Proteinstruktur könnte zudem zukünftig mittels AlphaFold erfolgen. Mittels AlphaFold kann die dreidimensionale Struktur von Proteinen basierend auf der entsprechenden Aminosäuresequenz mit einer gewissen Genauigkeit vorhersagt werden. Zudem wäre die Anwendung einer Kalzium-Bildgebung möglich, um die Auswirkungen einer veränderten Kalziumhomöostase intensiver zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

5.1 Charakterisierung von TRIAC-Transportern

3,3',5-Trijodthyroessigsäure (TRIAC) ist ein T3-Analogon, welches am nukleären T3-Rezeptor binden kann. TRIAC wird bereits bei Patienten mit Monocarboxylat-Transporter-8 (MCT8)-Defizienz (MCT8^{-/-}) eingesetzt. MCT8 wird vorwiegend in der Blut-Hirn-Schranke, sowie Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten exprimiert. Pathogene Mutationen im MCT8-Transportprotein führen zu einem T3-Mangel im Gehirn von Patienten, wodurch es zu neurologischen und kognitiven Beeinträchtigungen kommt. Eine Behandlungsmöglichkeit besteht in der Verwendung von TRIAC, jedoch sind die hierbei zugrundeliegenden Transportmechanismen bisher unklar. Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, potenzielle TRIAC-Transportproteine zu identifizieren, validieren und dessen Transporteigenschaften zu charakterisieren, sowie weitere Substrate zu identifizieren. Hierbei können *SLC29A2/ENT2* und *SLC22A9/OAT7* mittels radioaktiven Aufnahme-Assay und Co-Inkubation von Nitrobenzyl-6-thioinosin (NBTI) und Östron-3-Sulfat (E3S) als ¹²⁵I-TRIAC-Transporter validiert werden. Die Erhöhung der Substratverfügbarkeit führt zu einer erhöhten Bindungswahrscheinlichkeit der Substrate an die jeweiligen *SLC29A2/ENT2*- und *SLC22A9/OAT7*-Transportproteine, wodurch die Transportrate und Transportaktivität gesteigert werden kann. Die Transportkinetik ist die zeitliche Abhängigkeit der Transportaktivität.

SLC22A9/OAT7 ist zudem ein schwacher ¹²⁵I-TETRAC-Transporter, dessen ¹²⁵I-TRIAC-Aufnahme durch Co-Inkubation mit Sobetirome und DITPA reduziert werden kann. Die Identifizierung der TRIAC-Transportproteine, als auch Charakterisierung von 3,5,3',5'-Tetraiodthyroessigsäure (TETRAC)-, Sobetirome- und DITPA-Transporter kann dazu beitragen, das Verständnis zu den hier genannten Transportmechanismen im Kontext einer MCT8-Defizienz zu erweitern. Zudem können die Erkenntnisse dabei helfen, mögliche Medikamenteninteraktionen und unerwünschte Arzneimittelwirkungen besser zu verstehen. Erkenntnisse zum Expressionsort der TRIAC-Transportproteine im Gehirn, als auch der Peripherie, ermöglichen ein tieferes Verständnis hinsichtlich potenzieller Behandlungsmöglichkeiten bei Patienten mit MCT8-Defizienz.

5.1.1 Characterization of TRIAC-Transporters

3,3',5-Triiodothyroacetic acid (TRIAC) is a T3 analog that can bind to the nuclear T3 receptor. TRIAC is already used in patients with monocarboxylate transporter 8 (MCT8)-deficiency (MCT8^{-/-}). MCT8 is predominantly expressed in the blood-brain barrier, neurons, astrocytes and oligodendrocytes. Pathogenic mutations in the MCT8 transport protein lead to a T3-deficiency in the brain of patients, resulting in neurological and cognitive impairments. One treatment option is the use of TRIAC, but the underlying transport mechanisms are still unclear. The aim of this study is to identify and validate potential TRIAC transport proteins, to characterize their transport properties and to identify further substrates. Here, *SLC29A2/ENT2* and *SLC22A9/OAT7* can be validated as ¹²⁵I-TRIAC transporters by radioactive uptake assay and co-incubation of nitrobenzyl-6-thioinosine (NBTI) and estrone-3-sulfate (E3S). The increase in substrate availability leads to an increased binding probability of the substrates to the respective *SLC29A2/ENT2* and *SLC22A9/OAT7* transport proteins, which can increase the transport rate and transport activity. The transport kinetics is the temporal dependence of the transport activity.

SLC22A9/OAT7 is also a weak ¹²⁵I-TETRAC transporter and its ¹²⁵I-TRIAC uptake can be reduced by co-incubation with sobetirome and DITPA. The identification of the TRIAC transport proteins, as well as the characterization of 3,5,3',5' tetraiodothyroacetic acid (TETRAC), sobetirome and DITPA transporters can contribute to the understanding of the transport mechanisms mentioned here in the context of MCT8-deficiency. In addition, the findings can help to better understand possible drug interactions and adverse drug reactions. Findings on the expression site of the TRIAC transport proteins in the brain, as well as the periphery, allow a deeper understanding of potential treatment options for patients with MCT8-deficiency.

5.2 Merkmale von Mausmodellen des Allan-Herndon-Dudley-Syndroms

Erkrankungen, die auf Mutationen im MCT8-Transportprotein beruhen, sind als Allan-Herndon-Dudley Syndrom (AHDS) oder MCT8-Defizienz (MCT8^{-/-}) bekannt. Die Erkrankung betrifft nur männliche Patienten und besitzt eine geschätzte Prävalenz von 1:70.000. Zudem ist AHDS nicht heilbar und geht mit einer verkürzten Lebenserwartung

einher. Eine MCT8-Defizienz führt zu veränderten Schilddrüsenhormonwerten im Gehirn und der Peripherie von Patienten, welche eine periphere Thyreotoxikose, sowie kognitive Defizite und eine psychomotorische Retardierung infolge der Hypothyreose des Gehirns aufweisen. Mausmodelle dienen der Charakterisierung der Erkrankung, um die zugrundeliegenden pathologischen Mechanismen sowie mögliche therapeutische Ansätze zu erschließen. In diesem Kontext werden $Mct8^{L223R/y}$ ($hMCT8^{L291/R/y}$), $Mct8^{P253L/y}$ ($hMCT8^{P321L/y}$), $Mct8^{L366W/y}$ ($hMCT8^{L434W/y}$) und $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäuse histologisch untersucht und der perineuronale Netz (PNN) mittels *Wisteria floribunda* Agglutinin (WFA) als neuer Untersuchungsparameter bei einem MCT8-Defekt weiter charakterisiert. Hierbei sind in $Mct8^{L223R/y}$, $Mct8^{P253L/y}$, sowie vorwiegend $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäusen signifikante Veränderungen hinsichtlich der Zellzahl und Fluoreszenzintensität der Interneuronen Parvalbumin (PV), Calretinin (CR) und Calbindin (CB) ersichtlich. Zudem sind Expressionsunterschiede hinsichtlich der *Mct8*-, *Dio1*- und *Aldh1a1*-Expression im Gehirn, Leber und Niere von $Mct8^{L223R/y}$ Mäusen im Vergleich zum WT ersichtlich. Insbesondere $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäuse zeigen eine signifikante Reduktion von PV- und WFA-positiven Zellen im Barrel-Feld des primären-somatosensorischen-Kortex 1 (S1BF). Zudem besteht eine signifikante Reduktion hinsichtlich der Myelinintensität im Cingulum bundle des Corpus Callosum. Aus den Ergebnissen ergibt sich, dass $Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-}$ Mäuse das vorteilhafteste Mausmodell zur Untersuchung eines potenziell neurologischen Phänotyps und insbesondere des PNN darstellen. Zukünftig können die hier dargestellten Ergebnisse zu einem besseren Verständnis der Auswirkungen eines MCT8-Defekts in Patienten beitragen und bei der Charakterisierung therapeutischer Ansätze helfen. Das PNN war bisher bei Patienten mit MCT8-Defizienz unberücksichtigt. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zum PNN in Mausmodellen könnten ebenfalls zu einem besseren Verständnis der Auswirkungen bei einer MCT8-Defizienz in Patienten beitragen und ein tieflegendes Verständnis der Erkrankung ermöglichen.

5.2.1 Features of Maus models for Allan-Herndon-Dudley syndrome

Diseases caused by mutations in the MCT8 transport protein are known as Allan-Herndon-Dudley syndrome (AHDS) or MCT8-defect (MCT8^{-/-}). The disease only affects male patients and has an estimated prevalence of 1:70.000. AHDS is also incurable and is associated with a shorter life expectancy. MCT8-deficiency leads to altered thyroid hormone levels in the brain and periphery of patients with peripheral thyrotoxicosis, cognitive deficits and psychomotor retardation due to hypothyroidism of the brain. Mouse models are used to characterize the disease in order to identify the underlying pathological mechanisms and possible therapeutic approaches. In this context, Mct8^{L223R/y} (hMCT8^{L291/R/y}), Mct8^{P253L/y} (hMCT8^{P321L/y}), Mct8^{L366W/y} (hMCT8^{L434W/y}) and Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-} mice were examined histologically and the perineuronal network (PNN) was further characterized using *Wisteria floribunda* agglutinin (WFA) as a new test parameter for MCT8 defects. In Mct8^{L223R/y}, Mct8^{P253L/y}, and predominantly Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-} mice, significant changes in the cell number and fluorescence intensity of the parvalbumin (PV), calretinin (CR) and calbindin (CB) interneurons are evident.

In addition, expression differences regarding *Mct8*-, *Dio1*- and *Aldh1a1*-expression are evident in the brain, liver and kidney of Mct8^{L223R/y} mice compared to WT. In particular, Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-} mice show a significant reduction of PV- and WFA-positive cells in the barrel field of the primary somatosensory cortex (S1BF). In addition, there is a significant reduction in myelin intensity in the cingulum bundle of the corpus callosum. The results indicate that Mct8^{P253L/y};Oatp1c1^{-/-} mice are the most advantageous mouse model to study a potential neurological phenotype and PNN in particular. In the future, the results presented here may contribute to a better understanding of the effects of MCT8-deficiency in patients and help characterize therapeutic approaches. The PNN has so far not been considered in patients with MCT8-deficiency. The results presented in this paper on PNN in mouse models could contribute to a better understanding of the effects of MCT8-deficiency in patients and provide a deeper understanding of the disease.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der anatomischen und molekularen Struktur der Schilddrüse.....	11
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Biosynthese und Charakterisierung von 3,3',5-Trijodthyronin (T3), sowie 3,3',5,5'-Tetraiodthyronin (T4).	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse (HPT).....	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung des MCT8- (A) und OATP1C1-Transportproteins (B).....	15
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Transportproteine und Wirkung von Schilddrüsenhormonen.....	18
Abbildung 6: Schematische Darstellung der molekularbiologischen Pathologie von Patienten mit Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) Defekt.	20
Abbildung 7: Schematische Darstellung hinsichtlich der Anzahl vorhandener OATP1C1-Transportproteine zwischen gesunden und MCT8 ^{-/-} -defizienten Menschen und Mäusen.....	21
Abbildung 8: Schematische Darstellung der perineuronalen Netz (PNN) Struktur.....	23
Abbildung 9: Schematische Darstellung der chemischen Struktur von 3,5,3',5'-Tetraiodthyroessigsäure (TETRAC), 3,3',5-Trijodthyroessigsäure (TRIAC),3,3',5,5'-Tetraiodthyronin (T4) und 3,3',5-Trijodthyronin (T3).	24
Abbildung 10: SLC29A2_pCMV6-entry (A), SLC22A9_pCMV6-entry (B) und ABCD1_pCMV6-entry Vektor (C).	34
Abbildung 11: Schematische Darstellung des siRNA-Screenings zur Eingrenzung der potenziellen TRIAC-Kandidatengene SLC29A2/ENT2, SLC22A9/OAT7 und ABCD1/ALDP.	63
Abbildung 12: Schematische Darstellung zur Quantifizierung der Zellen.....	64
Abbildung 13: Repräsentative Darstellung von Überexpressionsklonen der jeweiligen Kandidatengene SLC29A2/ENT2 (A), SLC22A9/OAT7 (B) und ABCD1/ALDP (C).	65
Abbildung 14: Repräsentative Darstellung der Proteindetektion von SLC29A2/ENT2, SLC22A9/OAT7 und ABCD1/ALDP.....	66

Abbildung 15: Lokalisierung und transgene Expression des SLC29A2/ENT2-Transportproteins in überexprimierenden MDCK1-Zellen.	70
Abbildung 16: Lokalisierung und transgene Expression des SLC22A9/OAT7-Transportproteins in überexprimierenden MDCK1-Zellen.	71
Abbildung 17: Lokalisierung und transgene Expression des ABCD1/ALDP-Transportproteins in überexprimierenden MDCK1-Zellen..	71
Abbildung 18: Transportaktivität und Zeitverlaufsanalyse von ¹²⁵ I-TRIAC in SLC29A2/ENT2- (A) und SLC22A9/OAT7-Überexpressionsklonen (B).	74
Abbildung 19: Inhibition der ¹²⁵ I-TRIAC-Aufnahme mittels Co-Inkubation der jeweiligen Kompetitoren nach 3 Minuten.....	75
Abbildung 20: ¹²⁵ I-TRIAC-Aufnahme bei konzentrationsabhängiger Co-Inkubation mit 10 µM, 20 µM, 50 µM und 100 µM nicht-radioaktivem TRIAC nach 3 min in SLC29A2/ENT2- und SLC29A2/ENT2-Überexpressionsklonen.	77
Abbildung 21: Transportaktivität und Zeitverlaufsanalyse von ¹²⁵ I-TRIAC bei Co-Inkubation mit 10 µM nicht-radioaktiven TRIAC (n = 4).	78
Abbildung 22: Transportfähigkeit von ¹²⁵ I-rT3 und ¹²⁵ I-T3 in SLC29A2/ENT2- und SLC22A9/OAT7-Überexpressionsklonen nach 15 Minuten.	80
Abbildung 23: Transportfähigkeit von ¹²⁵ I-TRIAC in SLC22A9/OAT7-Überexpressionsklonen bei Co-Inkubation mit nicht-radioaktivem DITPA und Sobetirome nach 5 Minuten.....	81
Abbildung 24: Transportaktivität und Zeitverlaufsanalyse von ¹²⁵ I-TETRAC in SLC22A9/OAT7-Überexpressionsklonen..	82
Abbildung 25: Körperlänge und Körpergewicht von 4-Wochen alten Mct8 ^{+y} , Mct8 ^{L366W/y} (A, B, C), Mct8 ^{P253L/y} (D, E, F) und Mct8 ^{L223R/y} (G, H, I) Mäusen.....	85
Abbildung 26: Repräsentative Makroskopie eines Mct8 ^{+y} (A, B, C), Mct8 ^{L366W/y} (D), Mct8 ^{P253L/y} (E) und Mct8 ^{L223R/y} (F) Gehirns.	86
Abbildung 27: Schematische Darstellung der murinen Mct8-Punktmutationen, sowie der entsprechenden korrespondierenden humanen MCT8-Punktmutationen.	87
Abbildung 28: Schematische und strukturelle Darstellung der murinen und humanen Punktmutation innerhalb des Mct8/MCT8-Transportproteins und dessen Lokalisation.	89

Abbildung 29: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von Gehirnschnitten mit markiertem (weißes Rechteck) primären-somatosensorischen-Kortex 1 (A, B, C, D) und Barrel-Feld (E, F, G, H).....	92
Abbildung 30: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung von DAPI-gefärbten Zellen, sowie Calretinin (CR)- und Parvalbumin (PV)-positiven Zellen in der S1BF-Region von Mct8 ^{L223R/y} (A, B, C, D), Mct8 ^{L366W/y} (E, F, G, H) und Mct8 ^{+/y} (I, J, K, L), Gehirnschnitten.	93
Abbildung 31: Zellzahl DAPI-gefärbter Zellen im primären-somatosensorischen-Kortex 1 von Mct8 ^{+/y} , Mct8 ^{L366W/y} (A) und Mct8 ^{L223R/y} (B) Mäusen.....	93
Abbildung 32: Zellzahl und Fluoreszenzintensität von PV-positiven Zellen im primären-somatosensorischen-Kortex 1 von Mct8 ^{+/y} , Mct8 ^{L366W/y} und Mct8 ^{L223R/y} Mäusen.....	95
Abbildung 33: Zellzahl und Fluoreszenzintensität von CR-positiven Zellen im primären-somatosensorischen-Kortex 1 von Mct8 ^{+/y} , Mct8 ^{L366W/y} und Mct8 ^{L223R/y} Mäusen.....	96
Abbildung 34: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung der S1BF-Region eines koronalen Gefrierschnitts mit Detektion von DAPI-gefärbten Zellen, sowie PV- und WFA-positiven Zellen.	97
Abbildung 35: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung DAPI-gefärbter Zellen, sowie PV- und WFA-positiven Zellen in der S1-Region von Mct8 ^{+/y} , Mct8 ^{L223R/y} und Mct8 ^{L366W/y} Mäusen.....	98
Abbildung 36: Zellzahl, Fluoreszenzintensität und Korrelation von PV- und WFA-positiven Zellen im primären-somatosensorischen-Kortex 1 von Mct8 ^{+/y} und Mct8 ^{L366W/y} Mäusen.....	99
Abbildung 37: Zellzahl, Fluoreszenzintensität und Korrelation von PV- und WFA-positiven Zellen im primären-somatosensorischen-Kortex 1 von Mct8 ^{+/y} und Mct8 ^{L223R/y} Mäusen.....	100
Abbildung 38: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von Gehirnschnitten mit markiertem (weißes Rechteck) primären-somatosensorischen-Kortex 1 (A, B, C) und Barrel-Feld (D, E, F). Weiterhin ist die Pyramidenschicht (6a), sowie multifforme Schicht (6b) des Isokortex gezeigt (D, E, F)..	101
Abbildung 39: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung von DAPI-gefärbten Zellen und Calbindin positiven Zellen in der S1-Region von Mct8 ^{+/y} , Mct8 ^{L223R/y} und Mct8 ^{L366W/y} Mäusen.....	102

Abbildung 40: Zellzahl und Fluoreszenzintensität CB-positiver Zellen im primären-somatosensorischen-Kortex 1 von Mct8 ^{+/y} , Mct8 ^{L366W/y} und Mct8 ^{L223R/y} Mäusen....	103
Abbildung 41: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von Gehirnschnitten mit markiertem Cingulum bundle (weißes Rechteck) innerhalb des Corpus Callosum.	104
Abbildung 42: Myelinintensität im Cingulum bundle innerhalb des Corpus Callosum in Mct8 ^{+/y} , Mct8 ^{L366W/y} und Mct8 ^{L223R/y} Mäusen.....	105
Abbildung 43: Intensität von Myelin innerhalb des Cingulum bundle im Corpus Callosum von Mct8 ^{+/y} , Mct8 ^{L366W/y} und Mct8 ^{L223R/y} Mäusen.....	106
Abbildung 44: Zellzahl und Fluoreszenzintensität NeuN-positiver Zellen im primären-somatosensorischen-Kortex 1 von Mct8 ^{+/y} und Mct8 ^{L223R/y} Mäusen.....	106
Abbildung 45: Quantitative Echtzeit-PCR zur Analyse der Mct8- und Dio2-Genexpression im Hippocampus und Cerebellum von 4-Wochen alten Mct8 ^{+/y} und Mct8 ^{L223R/y} Tieren.	108
Abbildung 46: Quantitative Echtzeit-PCR zur Analyse der <i>Aldh1a1</i> -Genexpression im Cerebrum von 4-Wochen alten Mct8 ^{+/y} und Mct8 ^{L223R/y} Tieren.	109
Abbildung 47: Quantitative Echtzeit-PCR zur Analyse der Mct8-, Dio2- und Dio1-Genexpression im Herz, Leber und Niere von Mct8 ^{+/y} und Mct8 ^{L223R/y} Mäusen.....	110
Abbildung 48: Körperlänge und Körpergewicht von Mct8 ^{+/y} , Mct8 ^{P253L/y} und Mct8 ^{P253L/y} ;Oatp1c1 ^{-/-} Mäusen.....	112
Abbildung 49: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung von DAPI-gefärbten Zellen, sowie WFA- und PV-positiven Zellen in der S1BF-Region von Mct8 ^{+/y} , Mct8 ^{P253L/y} und Mct8 ^{P253L/y} ;Oatp1c1 ^{-/-} Mäusen.....	114
Abbildung 50: Zellzahl und Fluoreszenzintensität von WFA- und PV-positiven Zellen im Barrel-Feld des primären-somatosensorischen-Kortex 1 (S1BF) von Mct8 ^{+/y} , Mct8 ^{P253L/y} und Mct8 ^{P253L/y} ;Oatp1c1 ^{-/-} Mäusen.	116
Abbildung 51: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung von CR-positiven Zellen in der S1BF-Region von Mct8 ^{+/y} , Mct8 ^{P253L/y} und Mct8 ^{P253L/y} ;Oatp1c1 ^{-/-} Mäusen..	118
Abbildung 52: Zellzahl und Fluoreszenzintensität CR-positiver Zellen in der S1BF-Region von Mct8 ^{+/y} , Mct8 ^{P253L/y} und Mct8 ^{P253L/y} ;Oatp1c1 ^{-/-} Mäusen.	118
Abbildung 53: Myelinintensität im Cingulum bundle innerhalb des Corpus Callosum in Mct8 ^{+/y} und Mct8 ^{P253L/y} und Mct8 ^{P253L/y} ;Oatp1c1 ^{-/-} Mäusen.	119

Abbildung 54: Schematische Darstellung von SLC29A2/ENT2 und SLC22A9/OAT7 und transportierbarer Substrate.....	123
Abbildung 55: Charakterisierung eines möglichen neurologischen Phänotyps in Mct8 ^{L366W/y} und Mct8 ^{L223R/y} Mausmutanten.....	129
Abbildung 56: Charakterisierung eines möglichen neurologischen Phänotyps in Mct8 ^{P253L/y} und Mct8 ^{P253L/y} ;Oatp1c1 ^{-/-} Mäusen.	130
Abbildung 57: Korrelation zwischen PV- und WFA- positiven Zellen, sowie Auswirkungen eines T3-Mangels auf PV- und WFA-positive Zellen.	130

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien, Hersteller und Land.	30
Tabelle 2: Reagenziensysteme, Hersteller und Land.....	30
Tabelle 3: Geräte, Hersteller und Land.	31
Tabelle 4: Geräte, Hersteller und Land.	32
Tabelle 5: Datenbank and Hyperlinks.	32
Tabelle 6: Chemikalien, Lösungen, Hersteller und Land.....	32
Tabelle 7: Verwendete Plasmide, Gennamen und Open reading frame..	35
Tabelle 8: Verwendete Lösung.	35
Tabelle 9: Verwendet Ansätze.	36
Tabelle 10: Verwendete Lösung.....	37
Tabelle 11: Verwendete Plasmide, Primer und Sequenzen.	37
Tabelle 12: Verwendetes Nährmedium und Selektionsmedium.....	38
Tabelle 13: Verwendetes Einfriermedium.	39
Tabelle 14: Verwendete Puffer.....	40
Tabelle 15: Aufsteigende Konzentrationsreihe mittels Bradford-Lösung.....	41
Tabelle 16: Verwendete Lösung und Standard.	42
Tabelle 17: Verwendete Puffer.....	43
Tabelle 18: Verwendet Puffer und Lösungen zur Herstellung eines Polyacrylamidgels.	43
Tabelle 19: Verwendete Puffer.....	44
Tabelle 20: Verwendete Puffer für die Immunfärbung von Überexpressionsklonen.....	46
Tabelle 21: Verwendete Antikörper und Fluorochrome..	46
Tabelle 22: Verwendete Isotope, spezifische Aktivität, Gesamtaktivität und Hersteller..	49
Tabelle 23: Verwendete nicht-radioaktive Komponenten mit Lösungsmittel und Stockkonzentration.	50
Tabelle 24: Verwendete murine Mct8-Mausmutanten und korrespondierende humanpathogene MCT8-Punktmutationen in Patienten..	52
Tabelle 25: Verwendeter PCR-Ansatz zur Genotypisierung der Mauslinien.	53
Tabelle 26: Verwendete Primer und Sequenzen.....	54
Tabelle 27: Verwendetes PCR-Protokoll.....	55

Tabelle 28: Verwendete Puffer und Lösungen.	55
Tabelle 29: Verwendete Puffer zur Kryokonservierung.	56
Tabelle 30: Verwendete Puffer für die Immunfärbungen.	57
Tabelle 31: Verwendete Puffer und Lösungen.	59
Tabelle 32: Verwendeter Ansatz zur cDNA-Synthese.	59
Tabelle 33: Verwendetes cDNA-Synthese Protokoll.	60
Tabelle 34: Verwendeter Ansatz für die qPCR.	60
Tabelle 35: Verwendete Primer und Sequenzen zur Genotypisierung.	61
Tabelle 36: Verwendetes qPCR Protocol.	61

8 Literaturverzeichnis

Alanko, L., Porkka-Heiskanen, T., & Soinila, S. (2006). Localization of equilibrative nucleoside transporters in the rat brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *31*(3), 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2005.12.001>

Armstrong, M., Asuka, E., & Fingeret, A. (2024). Physiology, Thyroid Function. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537039/>

Bárez-López, S., Grijota-Martínez, C., Liao, X.-H., Refetoff, S., & Guadaño-Ferraz, A. (2019). Intracerebroventricular administration of the thyroid hormone analog TRIAC increases its brain content in the absence of MCT8. *PLoS One*, *14*(12), e0226017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226017>

Bárez-López, S., Hartley, M. D., Grijota-Martínez, C., Scanlan, T. S., & Guadaño-Ferraz, A. (2018). Sobetirome and its Amide Prodrug Sob-AM2 Exert Thyromimetic Actions in Mct8-Deficient Brain. *Thyroid*, *28*(9), 1211–1220. <https://doi.org/10.1089/thy.2018.0008>

Bárez-López, S., Obregon, M. J., Martínez-de-Mena, R., Bernal, J., Guadaño-Ferraz, A., & Morte, B. (2016). Effect of Triiodothyroacetic Acid Treatment in Mct8 Deficiency: A Word of Caution. *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, *26*(5), 618–626. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0388>

Becker, P. C., Güth-Steffens, M., Lazarow, K., Sonntag, N., Braun, D., Masfaka, I., Renko, K., Schomburg, L., Köhrle, J., von Kries, J. P., Schweizer, U., Krause, G., & Protze, J. (2024). Identification of Human TRIAC Transmembrane Transporters. *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, *34*(7), 920–930. <https://doi.org/10.1089/thy.2023.0592>

Beynon, M. E., & Pinneri, K. (2016). An Overview of the Thyroid Gland and Thyroid-Related Deaths for the Forensic Pathologist. *Academic Forensic Pathology*, *6*(2), 217–236. <https://doi.org/10.23907/2016.024>

- Bokulić, A., Padovan, J., Stupin-Polančec, D., & Milić, A. (2022). Isolation of MDCK cells with low expression of *mdr1* gene and their use in membrane permeability screening. *Acta Pharmaceutica (Zagreb, Croatia)*, *72*(2), 275–288. <https://doi.org/10.2478/acph-2022-0003>
- Braun, D., Kim, T. D., le Coutre, P., Köhrle, J., Hershman, J. M., & Schweizer, U. (2012). Tyrosine kinase inhibitors noncompetitively inhibit MCT8-mediated iodothyronine transport. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *97*(1), E100-105. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-1837>
- Braun, D., & Schweizer, U. (2014). Authentic bosutinib inhibits triiodothyronine transport by monocarboxylate transporter 8. *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, *24*(5), 926–927. <https://doi.org/10.1089/thy.2013.0660>
- Braun, D., & Schweizer, U. (2020). The Protein Translocation Defect of MCT8L291R Is Rescued by Sodium Phenylbutyrate. *European Thyroid Journal*, *9*(5), 269–280. <https://doi.org/10.1159/000507439>
- Chen, Z., Yildiz, S., Markova, B., de Rooij, L. J., Leeuwenburgh, S., Hamers, T., Peeters, R. P., Heuer, H., Meima, M. E., & Visser, W. E. (2024). 3,3',5-Triiodothyroacetic Acid Transporters. *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, *34*(8), 1027–1037. <https://doi.org/10.1089/thy.2023.0467>
- Christensen, A. C., Lensjø, K. K., Lepperød, M. E., Dragly, S.-A., Sutterud, H., Blackstad, J. S., Fyhn, M., & Hafting, T. (2021). Perineuronal nets stabilize the grid cell network. *Nature Communications*, *12*, 253. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20241-w>
- Deepa, S. S., Carulli, D., Galtrey, C., Rhodes, K., Fukuda, J., Mikami, T., Sugahara, K., & Fawcett, J. W. (2006). Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: A different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(26), 17789–17800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600544200>
- Diallinas, G. (2014). Understanding transporter specificity and the discrete appearance of channel-like gating domains in transporters. *Frontiers in Pharmacology*, *5*, 207. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00207>

Domowicz, M. S., Sanders, T. A., Ragsdale, C. W., & Schwartz, N. B. (2008). AGGREGAN IS EXPRESSED BY EMBRYONIC BRAIN GLIA AND REGULATES ASTROCYTE DEVELOPMENT. *Developmental biology*, 315(1), 114–124.

<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.12.014>

Druga, R., Salaj, M., & Al-Redouan, A. (2023). Parvalbumin - Positive Neurons in the Neocortex: A Review. *Physiological Research*, 72(Suppl 2), S173–S191.

<https://doi.org/10.33549/physiolres.935005>

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), 168–175. <https://doi.org/10.1086/380999>

Eggermann, E., & Jonas, P. (2011). How the „slow“ Ca(2+) buffer parvalbumin affects transmitter release in nanodomain-coupling regimes. *Nature Neuroscience*, 15(1), 20–22.

<https://doi.org/10.1038/nn.3002>

Emami Riedmaier, A., Burk, O., van Eijck, B. a. C., Schaeffeler, E., Klein, K., Fehr, S., Biskup, S., Müller, S., Winter, S., Zanger, U. M., Schwab, M., & Nies, A. T. (2016). Variability in hepatic expression of organic anion transporter 7/*SLC22A9*, a novel pravastatin uptake transporter: Impact of genetic and regulatory factors. *The Pharmacogenomics Journal*, 16(4), 341–351. <https://doi.org/10.1038/tpj.2015.55>

Enwright, J. F., Sanapala, S., Foglio, A., Berry, R., Fish, K. N., & Lewis, D. A. (2016). Reduced Labeling of Parvalbumin Neurons and Perineuronal Nets in the Dorsolateral Prefrontal Cortex of Subjects with Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 41(9), 2206–2214.

<https://doi.org/10.1038/npp.2016.24>

Fawcett, J. W., Fyhn, M., Jendelova, P., Kwok, J. C. F., Ruzicka, J., & Sorg, B. A. (2022). The extracellular matrix and perineuronal nets in memory. *Molecular Psychiatry*, 27(8), 3192–3203.

<https://doi.org/10.1038/s41380-022-01634-3>

Feldt-Rasmussen, U., Effraimidis, G., & Klose, M. (2021). The hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT)-axis and its role in physiology and pathophysiology of other hypothalamus-pituitary functions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 525, 111173. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111173>

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), 92–102. <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. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 380. <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 & Endocrinology*, 7(9), 695–706. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(19\)30155-X](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30155-X)

Groeneweg, S., Peeters, R. P., Visser, T. J., & Visser, W. E. (2017). Triiodothyroacetic acid in health and disease. *The Journal of Endocrinology*, 234(2), R99–R121. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0113>

Groeneweg, S., van Geest, F. S., Peeters, R. P., Heuer, H., & Visser, W. E. (2020). Thyroid Hormone Transporters. *Endocrine Reviews*, 41(2), bnz008. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnz008>

Härtig, W., Meinicke, A., Michalski, D., Schob, S., & Jäger, C. (2022). Update on Perineuronal Net Staining With Wisteria floribunda Agglutinin (WFA). *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 16, 851988. <https://doi.org/10.3389/fnint.2022.851988>

Hasel, P., Dando, O., Jiwaji, Z., Baxter, P., Todd, A. C., Heron, S., Márkus, N. M., McQueen, J., Hampton, D. W., Torvell, M., Tiwari, S. S., McKay, S., Eraso-Pichot, A., Zorzano, A., Masgrau, R., Galea, E., Chandran, S., Wyllie, D. J. A., Simpson, T. I., & Hardingham, G. E. (2017). Neurons and neuronal activity control gene expression in astrocytes to regulate their development and metabolism. *Nature Communications*, *8*, 15132. <https://doi.org/10.1038/ncomms15132>

Heuer, H., Maier, M. K., Iden, S., Mittag, J., Friesema, E. C. H., Visser, T. J., & Bauer, K. (2005). The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations. *Endocrinology*, *146*(4), 1701–1706. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1179>

Holzer, G., Roux, N., & Laudet, V. (2017). Evolution of ligands, receptors and metabolizing enzymes of thyroid signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *459*, 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.03.021>

Horn, S., Kersseboom, S., Mayerl, S., Müller, J., Groba, C., Trajkovic-Arsic, M., Ackermann, T., Visser, T. J., & Heuer, H. (2013). Tetrac can replace thyroid hormone during brain development in mouse mutants deficient in the thyroid hormone transporter mct8. *Endocrinology*, *154*(2), 968–979. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1628>

Impact of Oatp1c1 Deficiency on Thyroid Hormone Metabolism and Action in the Mouse Brain | Endocrinology | Oxford Academic. (o. J.). Abgerufen 28. Dezember 2024, von <https://academic.oup.com/endo/article-abstract/153/3/1528/2424203?redirectedFrom=fulltext>

Impact of Oatp1c1 deficiency on thyroid hormone metabolism and action in the mouse brain—PubMed. (o. J.). Abgerufen 28. Dezember 2024, von <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22294745/>

Iwayama, H., Tanaka, T., Aoyama, K., Moroto, M., Adachi, S., Fujisawa, Y., Matsuura, H., Takano, K., Mizuno, H., & Okumura, A. (2021). Regional Difference in Myelination in Monocarboxylate Transporter 8 Deficiency: Case Reports and Literature Review of Cases in Japan. *Frontiers in Neurology*, *12*, 657820. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.657820>

Jiang, X., Lachance, M., & Rossignol, E. (2016). Involvement of cortical fast-spiking parvalbumin-positive basket cells in epilepsy. *Progress in Brain Research*, 226, 81–126. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2016.04.012>

Kersseboom, S., Horn, S., Visser, W. E., 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 (Baltimore, Md.)*, 28(12), 1961–1970. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1135>

Khan, Y. S., & Farhana, A. (2024a). Histology, Thyroid Gland. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551659/>

Kim, Y., Park, J., & Choi, Y. K. (2019). The Role of Astrocytes in the Central Nervous System Focused on BK Channel and Heme Oxygenase Metabolites: A Review. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(5), 121. <https://doi.org/10.3390/antiox8050121>

Kimoto, S., Bazmi, H. H., & Lewis, D. A. (2014). Lower expression of glutamic acid decarboxylase 67 in the prefrontal cortex in schizophrenia: Contribution of altered regulation by Zif268. *The American Journal of Psychiatry*, 171(9), 969–978. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2014.14010004>

Köhrle, J. (2019). The Colorful Diversity of Thyroid Hormone Metabolites. *European Thyroid Journal*, 8(3), 115–129. <https://doi.org/10.1159/000497141>

Lemieux, S. P., Lev-Ram, V., Tsien, R. Y., & Ellisman, M. H. (2023). Perineuronal nets and the neuronal extracellular matrix can be imaged by genetically encoded labeling of HAPLN1 in vitro and in vivo. *bioRxiv*, 2023.11.29.569151. <https://doi.org/10.1101/2023.11.29.569151>

Lipachev, N., Arnst, N., Melnikova, A., Jääliñoja, H., Kochneva, A., Zhigalov, A., Kuleskaya, N., Aganov, A. V., Mavlikeev, M., Rauvala, H., Kiyasov, A. P., & Paveliev, M. (2019). Quantitative changes in perineuronal nets in development and posttraumatic condition. *Journal of Molecular Histology*, 50(3), 203–216. <https://doi.org/10.1007/s10735-019-09818-y>

López-Espíndola, D., Morales-Bastos, C., Grijota-Martínez, C., Liao, X.-H., Lev, D., Sugo, E., Verge, C. F., Refetoff, S., Bernal, J., & Guadaño-Ferraz, A. (2014). Mutations of the thyroid hormone transporter MCT8 cause prenatal brain damage and persistent hypomyelination. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *99*(12), E2799-2804. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2162>

Lupori, L., Totaro, V., Cornuti, S., Ciampi, L., Carrara, F., Grilli, E., Viglione, A., Tozzi, F., Putignano, E., Mazziotti, R., Amato, G., Gennaro, C., Tognini, P., & Pizzorusso, T. (2023). A comprehensive atlas of perineuronal net distribution and colocalization with parvalbumin in the adult mouse brain. *Cell Reports*, *42*(7), 112788. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112788>

Maity-Kumar, G., Ständer, L., DeAngelis, M., Lee, S., Molenaar, A., Becker, L., Garrett, L., Amerie, O. V., Hoelter, S. M., Wurst, W., Fuchs, H., Feuchtinger, A., Gailus-Durner, V., Garcia-Caceres, C., Othman, A. E., Brockmann, C., Schöffling, V. I., Beiser, K., Krude, H., ... Müller, T. D. (2022). Validation of Mct8/Oatp1c1 dKO mice as a model organism for the Allan-Herndon-Dudley Syndrome. *Molecular Metabolism*, *66*, 101616. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101616>

Mangravite, L. M., Xiao, G., & Giacomini, K. M. (2003). Localization of human equilibrative nucleoside transporters, hENT1 and hENT2, in renal epithelial cells. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, *284*(5), F902-910. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00215.2002>

Mansourian, A. R. (2011). Metabolic pathways of tetraiodothyronine and triiodothyronine production by thyroid gland: A review of articles. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, *14*(1), 1–12. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2011.1.12>

Masnada, S., Sarret, C., Antonello, C. E., Fadilah, A., Krude, H., Mura, E., Mordekar, S., Nicita, F., Olivotto, S., Orcesi, S., Porta, F., Remerand, G., Siri, B., Wilpert, N.-M., Amir-Yazdani, P., Bertini, E., Schuelke, M., Bernard, G., Boespflug-Tanguy, O., & Tonduti, D. (2022). Movement disorders in MCT8 deficiency/Allan-Herndon-Dudley Syndrome. *Molecular Genetics and Metabolism*, *135*(1), 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2021.12.003>

- Matheus, M. G., Lehman, R. K., Bonilha, L., & Holden, K. R. (2015). Redefining the Pediatric Phenotype of X-Linked Monocarboxylate Transporter 8 (MCT8) Deficiency: Implications for Diagnosis and Therapies. *Journal of Child Neurology*, *30*(12), 1664–1668. <https://doi.org/10.1177/0883073815578524>
- 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. *The Journal of Clinical Investigation*, *124*(5), 1987–1999. <https://doi.org/10.1172/JCI70324>
- Mayerl, S., Visser, T. J., Darras, V. M., Horn, S., & Heuer, H. (2012). Impact of Oatp1c1 Deficiency on Thyroid Hormone Metabolism and Action in the Mouse Brain. *Endocrinology*, *153*(3), 1528–1537. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1633>
- Micheva, K. D., Kiraly, M., Perez, M. M., & Madison, D. V. (2021). Extensive Structural Remodeling of the Axonal Arbors of Parvalbumin Basket Cells during Development in Mouse Neocortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *41*(45), 9326–9339. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0871-21.2021>
- Morphett, J. C., Whittaker, A. L., Reichelt, A. C., & Hutchinson, M. R. (2024). Perineuronal net structure as a non-cellular mechanism contributing to affective state: A scoping review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *158*, 105568. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2024.105568>
- Morte, B., Gil-Ibáñez, P., & Bernal, J. (2018). Regulation of Gene Expression by Thyroid Hormone in Primary Astrocytes: Factors Influencing the Genomic Response. *Endocrinology*, *159*(5), 2083–2092. <https://doi.org/10.1210/en.2017-03084>
- Müller, J., & Heuer, H. (2012). Understanding the Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis in Mct8 Deficiency. *European Thyroid Journal*, *1*(2), 72–79. <https://doi.org/10.1159/000339474>
- Naes, S. M., Ab-Rahim, S., Mazlan, M., & Abdul Rahman, A. (2020a). Equilibrative Nucleoside Transporter 2: Properties and Physiological Roles. *BioMed Research International*, *2020*, 5197626. <https://doi.org/10.1155/2020/5197626>

Naes, S. M., Ab-Rahim, S., Mazlan, M., & Abdul Rahman, A. (2020b). Equilibrative Nucleoside Transporter 2: Properties and Physiological Roles. *BioMed Research International*, 2020(1), 5197626. <https://doi.org/10.1155/2020/5197626>

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—PubMed. (o. J.). Abgerufen 28. Dezember 2024, von <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19641107/>

Nigam, S. K. (2018). The SLC22 Transporter Family: A Paradigm for the Impact of Drug Transporters on Metabolic Pathways, Signaling, and Disease. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 58, 663–687. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052713>

Orduz, D., Bishop, D. P., Schwaller, B., Schiffmann, S. N., & Gall, D. (2013). Parvalbumin tunes spike-timing and efferent short-term plasticity in striatal fast spiking interneurons. *The Journal of Physiology*, 591(Pt 13), 3215–3232. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.250795>

Palczewska, M., Batta, G., Groves, P., Linse, S., & Kuznicki, J. (2005). Characterization of calretinin I-II as an EF-hand, Ca²⁺, H⁺-sensing domain. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 14(7), 1879–1887. <https://doi.org/10.1110/ps.051369805>

Protze, J., Braun, D., Hinz, K. M., Bayer-Kusch, D., Schweizer, U., & Krause, G. (2017). Membrane-traversing mechanism of thyroid hormone transport by monocarboxylate transporter 8. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 74(12), 2299–2318. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2461-9>

Qi, Y., Cheng, H., Wang, Y., & Chen, Z. (2021). Revealing the Precise Role of Calretinin Neurons in Epilepsy: We Are on the Way. *Neuroscience Bulletin*, 38(2), 209–222. <https://doi.org/10.1007/s12264-021-00753-1>

Reichelt, A. C., Hare, D. J., Bussey, T. J., & Saksida, L. M. (2019). Perineuronal Nets: Plasticity, Protection, and Therapeutic Potential. *Trends in Neurosciences*, 42(7), 458–470. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.04.003>

Rutgers, M., Heusdens, F. A., Bonthuis, F., & Visser, T. J. (1989). Metabolism of triiodothyroacetic acid (TA3) in rat liver. II. Deiodination and conjugation of TA3 by rat hepatocytes and in rats in vivo. *Endocrinology*, *125*(1), 433–443. <https://doi.org/10.1210/endo-125-1-433>

Sauve, S., Williamson, J., Polasa, A., & Moradi, M. (2023). Ins and Outs of Rocker Switch Mechanism in Major Facilitator Superfamily of Transporters. *Membranes*, *13*(5), 462. <https://doi.org/10.3390/membranes13050462>

Schweizer, U., Johannes, J., Bayer, D., & Braun, D. (2014). Structure and Function of Thyroid Hormone Plasma Membrane Transporters. *European Thyroid Journal*, *3*(3), 143–153. <https://doi.org/10.1159/000367858>

Shin, H. J., Anzai, N., Enomoto, A., He, X., Kim, D. K., Endou, H., & Kanai, Y. (2007). Novel liver-specific organic anion transporter OAT7 that operates the exchange of sulfate conjugates for short chain fatty acid butyrate. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *45*(4), 1046–1055. <https://doi.org/10.1002/hep.21596>

Strømme, P., Groeneweg, S., Lima de Souza, E. C., Zevenbergen, C., Torgersbråten, A., Holmgren, A., Gurcan, E., Meima, M. E., Peeters, R. P., Visser, W. E., Høneren Johansson, L., Babovic, A., Zetterberg, H., Heuer, H., Frengen, E., Misceo, D., & Visser, T. J. (2018). Mutated Thyroid Hormone Transporter OATP1C1 Associates with Severe Brain Hypometabolism and Juvenile Neurodegeneration. *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, *28*(11), 1406–1415. <https://doi.org/10.1089/thy.2018.0595>

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: A Journal of Neurology*, *145*(12), 4264–4274. <https://doi.org/10.1093/brain/awac243>

Testa, D., Prochiantz, A., & Di Nardo, A. A. (2019). Perineuronal nets in brain physiology and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *89*, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.09.011>

Tewari, B. P., Chaunsali, L., Prim, C. E., & Sontheimer, H. (2022). A glial perspective on the extracellular matrix and perineuronal net remodeling in the central nervous system. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16, 1022754. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.1022754>

THE THYROID GLAND - THE ENDOCRINE SYSTEM - Medical Physiology, 2e Updated Edition: With STUDENT CONSULT Online Access, 2e (MEDICAL PHYSIOLOGY (BORON)) 2nd Ed. (o. J.). Abgerufen 28. Dezember 2024, von <https://doctorlib.org/physiology/medical-physiology-molecular/50.html>

Thomas, J., Sairoz, Jose, A., Poojari, V. G., Shetty, S., K, S. P., Prabhu R V, K., & Rao, M. (2023). Role and Clinical Significance of Monocarboxylate Transporter 8 (MCT8) During Pregnancy. *Reproductive Sciences*, 30(6), 1758–1769. <https://doi.org/10.1007/s43032-022-01162-z>

Thyroid hormone transporters in the human—PubMed. (o. J.). Abgerufen 28. Dezember 2024, von <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22281883/>

Ueda, K., Hosokawa, M., & Iwakawa, S. (2015). Cellular Uptake of Decitabine by Equilibrative Nucleoside Transporters in HCT116 Cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 38(8), 1113–1119. <https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00622>

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, 105896. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105896>

van Geest, F. S., Groeneweg, S., van den Akker, E. L. T., Bacos, I., Barca, D., van den Berg, S. A. A., Bertini, E., Brunner, D., Brunetti-Pierri, N., Cappa, M., Cappuccio, G., Chatterjee, K., Chesover, A. D., Christian, P., Coutant, R., Craiu, D., Crock, P., Dewey, C., Dica, A., ... Visser, W. E. (2022). Long-Term Efficacy of T3 Analogue Triac in Children and Adults With MCT8 Deficiency: A Real-Life Retrospective Cohort Study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 107(3), e1136–e1147. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab750>

- van Geest, F. S., Gunhanlar, N., Groeneweg, S., & Visser, W. E. (2021). Monocarboxylate Transporter 8 Deficiency: From Pathophysiological Understanding to Therapy Development. *Frontiers in Endocrinology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.723750>
- van Putten, M. J. A. M., Fahlke, C., Kafitz, K. W., Hofmeijer, J., & Rose, C. R. (2021). Dysregulation of Astrocyte Ion Homeostasis and Its Relevance for Stroke-Induced Brain Damage. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5679. <https://doi.org/10.3390/ijms22115679>
- Vancamp, P., Demeneix, B. A., & Remaud, S. (2020). Monocarboxylate Transporter 8 Deficiency: Delayed or Permanent Hypomyelination? *Frontiers in Endocrinology*, 11, 283. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00283>
- 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. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(12), 4515–4523. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-2556>
- Ward, J. L., Sherali, A., Mo, Z. P., & Tse, C. M. (2000). Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 cells. Ent2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for inosine. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8375–8381. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8375>
- Wémeau, J. L., Pigeyre, M., Proust-Lemoine, E., d'Herbomez, M., Gottrand, F., Jansen, J., Visser, T. J., & Ladsous, M. (2008). Beneficial effects of propylthiouracil plus L-thyroxine treatment in a patient with a mutation in MCT8. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(6), 2084–2088. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2719>
- Xiong, C., Jia, L.-N., Xiong, W.-X., Wu, X.-T., Xiong, L.-L., Wang, T.-H., Zhou, D., Hong, Z., Liu, Z., & Tang, L. (2023). Structural insights into substrate recognition and translocation of human peroxisomal ABC transporter ALDP. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01280-9>

Yokoyama, H., Anzai, N., Ljubojevic, M., Ohtsu, N., Sakata, T., Miyazaki, H., Nonoguchi, H., Islam, R., Onozato, M., Tojo, A., Tomita, K., Kanai, Y., Igarashi, T., Sabolic, I., & Endou, H. (2008). Functional and immunochemical characterization of a novel organic anion transporter Oat8 (*SLC22A9*) in rat renal collecting duct. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 21(4), 269–278. <https://doi.org/10.1159/000129385>

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allem bedanken, die mich auf dem Weg zur Fertigstellung der Doktorarbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Thomas Becker, für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit anfertigen zu können, sowie insbesondere für die Übernahme des Erstgutachtens und der Betreuung. Gerne möchte ich mich herzlich für die Expertise und maßgebliche Unterstützung im Kontext meiner Doktorarbeit bedanken.

Gerne möchte ich mich bei PD Dr. Matthias Eckhardt für die Unterstützung, Durchsicht und konstruktiven Anmerkungen im Kontext meiner Doktorarbeit bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Jens Mittag und Prof. Dr. Christian Henneberger für die Übernahme des Gutachtens bedanken.

Ein weiterer Dank gilt der AG Becker und der damit verbundenen Möglichkeit zur Durchführung von qPCR Analysen.

Gerne möchte ich mich für die gruppenübergreifende Bereitstellung von Material und Geräten bedanken, welche meine Doktorarbeit ermöglichten. Nicht zuletzt gilt mein Dank allen Kooperationspartnern, Kollegen, Professoren und Kommilitonen, die mich während der Doktorarbeit unterstützt haben. Ich bedanke mich zudem bei der AG Schweizer für die Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten Materialien und die dargelegte Aufgabenstellung.

Ein Dankeschön geht auch an meine Familie, sowie insbesondere meinen Freunden und Geschwistern, die mich bestärkt, unterstützt und inspiriert haben.