

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

Ist ein verändertes Spleißen im *SLC5A5*-Gen (*Natrium-Iod-Symporter*-Gen)
Ursache für eine angeborene Hypothyreose?

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

Vorgelegt von

Sandra Gessner
aus Mosbach

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Ulrich Förstermann

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Joachim Pohlenz

2. Gutachter: Dr. rer. nat. Pia Hermanns

Tag der Promotion: 06. Dezember 2022

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | 4 |
| Abkürzungsverzeichnis | 6 |
| Tabellen- und Bilderverzeichnis | 10 |
| 1. Einleitung | 12 |
| 2. Literaturdiskussion | 14 |
| 2.1. Schilddrüsenentwicklung | 14 |
| 2.2. Funktion der Schilddrüse | 16 |
| 2.3. Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse | 17 |
| 2.4. Schilddrüsenhormonbiosynthese | 20 |
| 2.5. Physiologischer Einfluss der Schilddrüsenhormone | 24 |
| 2.6. Krankheitsbilder der Schilddrüse | 26 |
| 2.6.1. Hyperthyreose | 26 |
| 2.6.2. Hypothyreose | 27 |
| 2.7. Natrium-Iod-Symporter (NIS) | 30 |
| 2.7.1. Funktion..... | 30 |
| 2.7.2. Regulation..... | 32 |
| 2.7.3. Genlokalisierung und Struktur | 33 |
| 2.8. Patienten | 35 |
| 2.8.1. Patient 1 | 35 |
| 2.8.2. Patient 2 | 37 |
| 3. Material und Methoden | 40 |
| 3.1. Material | 40 |
| 3.1.1. Kits | 40 |
| 3.1.2. Geräte..... | 40 |
| 3.1.3. Primersequenzen..... | 41 |
| 3.1.4. Enzyme | 42 |
| 3.1.5. Spleißvektoren | 42 |
| 3.1.6. Bakterien | 43 |
| 3.1.7. Zellen | 43 |
| 3.1.8. Plastikverbrauchsmaterialien | 44 |
| 3.1.9. Weitere Materialien..... | 44 |
| 3.2. Methoden | 45 |
| 3.2.1. Isolation genomischer DNA aus EDTA-Blut | 45 |
| 3.2.2. Long Range PCR..... | 45 |
| 3.2.3. Gelelektrophorese | 48 |
| 3.2.4. Aufreinigung der PCR Produkte | 48 |
| 3.2.5. Restriktion | 49 |
| 3.2.6. Aufreinigung der restringierten PCR Produkte | 49 |
| 3.2.7. Dephosphorylierung | 50 |
| 3.2.8. Gelaufreinigung..... | 50 |
| 3.2.9. Ligation..... | 51 |
| 3.2.10. Transformation | 51 |
| 3.2.11. Agarplatten-Herstellung | 51 |
| 3.2.12. Herstellung LB-Medium mit Ampicillin | 52 |
| 3.2.13. Überführung einzelner Kolonien in ein LB-Medium | 52 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.14. Plasmid Miniprep | 52 |
| 3.2.15. Kontrollrestriktionsverdau der Plasmide..... | 53 |
| 3.2.16. Sanger-Sequenzierung..... | 53 |
| 3.2.17. Fällung der Sequenzprodukte..... | 54 |
| 3.2.18. Kultivierung von HeLa-Zellen..... | 54 |
| 3.2.19. Transfektion..... | 54 |
| 3.2.20. RNA Extraktion | 55 |
| 3.2.21. Reverse Transkription..... | 56 |
| 3.2.22. RT cDNA PCR | 57 |
| 3.2.23. Aufreinigung der cDNA nach PCR..... | 58 |
| 3.2.24. Sequenzierung der cDNA..... | 58 |
| 3.2.25. Fällung der Sequenzprodukte der cDNA | 58 |
| 3.2.26. Subklonierung der cDNA mit Ligation in pGem-T Vektor | 59 |
| 4. Ergebnisse | 60 |
| 4.1. Long Range PCR Gelelektrophorese..... | 60 |
| 4.2. Plasmid-Prep-Gelelektrophorese | 61 |
| 4.3. cDNA PCR Kontrolle nach Reverser Transkription | 62 |
| 4.4. Sequenzierung der cDNA..... | 62 |
| 4.4.1. NIS-Genabschnitt Exon 5-7..... | 63 |
| Sequenz des Spleißproduktes NIS 5-7 Mutation c.743T>C, p.V248A | 63 |
| 4.4.2. NIS-Genabschnitt Exon 7-10 | 64 |
| Sequenzen der Spleißprodukte NIS 7-10 Mutation c.1058+5G>C | 65 |
| 5. Diskussion | 67 |
| 5.1. Spleißen..... | 67 |
| 5.1.1. Übersicht über das prä-mRNA Spleißen | 67 |
| 5.1.2. Spleißosom..... | 69 |
| 5.1.3. Alternatives Spleißen | 71 |
| 5.1.4. Spleiß Enhancer und Silencer | 73 |
| 5.1.5. Nonsense-mediated decay..... | 75 |
| 5.2. Vergleich des Spleißverhaltens der hier untersuchten Mutationen. | 77 |
| 5.2.1. NIS Mutation c.743T>C, p.V248A | 77 |
| 5.2.2. NIS Mutation c.1058+5G>C | 77 |
| 5.3. Tertiär und Quartär Struktur des NIS..... | 80 |
| 5.4. Mögliche Auswirkungen der hier untersuchten Mutationen auf die NIS Funktion | 82 |
| 5.4.1. NIS Mutation c.743T>C, p.V248A | 82 |
| 5.4.2. NIS Mutation c.1058+5G>C | 83 |
| 5.5. Vergleich mit den bereits bekannten Mutationen im NIS-Gen..... | 86 |
| 5.6. Klinische Relevanz der hier untersuchten Mutationen | 89 |
| 5.7. Ausblick..... | 93 |
| 6. Zusammenfassung..... | 97 |
| 7. Literaturverzeichnis | 99 |
| Danksagung | 104 |
| Tabellarischer Lebenslauf | 105 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |
| A | Adenin |
| AIT | apikaler Iodidtransporter |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BP | <i>branch point</i> , Verzweigungspunkt |
| bp | Basenpaar |
| C | Cytosin |
| c | Konzentration |
| c. | Nukleotidposition in der c.DNA |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| Cas | <i>CRISPR associated Protein</i> |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> = komplementäre DNA |
| ClO ⁻ | Hypochlorid |
| ClO ₄ ⁻ | Perchlorat |
| CRISPR | <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> |
| DIT | 3,5'-Diodtyrosin |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| DPBS | Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline |
| DUOX1/DUOX2 | Dual-Oxidase 1 und 2 |
| DUOXA2 | Dual-Oxidase A2 |
| E. coli | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ESE | <i>Exonic Splice Enhancer</i> |
| ESS | <i>Exonic Splice Silencer</i> |
| FFP | <i>Fresh Frozen Plasma</i> |
| fT ₃ | freies Triiodthyronin |
| fT ₄ | freies Thyroxin |

| | |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| G | Guanin |
| g | Gramm |
| GH | <i>Growth Hormone</i> , Wachstumshormon |
| G-Protein | Guanosintriphosphat-bindendes Protein (GTP-Protein) |
| h | Stunde/n |
| H ₂ O | Wasser |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| <i>HBB</i> -Gen | <i>Hemoglobin Subunit Beta</i> Gen |
| HeLa-Zellen | Henrietta Lacks Cervix Carcinom Zellen |
| hnRNPs | <i>heterogeneous ribonucleoprotein particles</i> |
| IQ | Intelligenz Quotient |
| ISE | <i>Intronic Splice Enhancer</i> |
| ISS | <i>Intronic Splice Silencer</i> |
| IYD (DHEAL1) | Iodotyrosin Dehalogenase 1, Iodotyrosin Deiodinase 1 |
| kb | Kilobasenpaare |
| KCNQ1/KCNE2 K+ | <i>Potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1 and subfamily E member 2</i> = spannungsgesteuerte Kaliumkanäle der Familien Q Nr.1 und E Nr.2 |
| kDa | Kilodalton |
| Km-Wert | Michaelis-Menten-Konstante, Enzymaffinität |
| LB-Medium | Lysogeny Broth Medium (Nährmedium) |
| Luc | <i>Luziferase</i> |
| MCT 8 | Monocarboxylat Transporter 8 |
| MCT 10 | Monocarboxylat Transporter 10 |
| MgCl ₂ | Magnesiumdichlorid |
| min | Minute/n |
| MIT | 3-Moniodotyrosin |
| ml | Milliliter |
| mRNA | <i>messenger ribonucleic acid</i> = Boten-Ribonukleinsäure |
| m-RNS | <i>messenger</i> Ribonukleinsäure = mRNA |
| mut | mutiert |
| N | Nukleotidbasen (Adenin, Cytosin, Guanin, Tyrosin/Uracil) |
| <i>Na⁺-K⁺-ATPase</i> | <i>Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase</i> |
| ng | Nanogramm |

| | |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| NIS | Natrium-Iod-Symporter |
| NO ⁻ | Hyponitrit |
| nt | Nukleotide |
| p. | Aminosäureposition im Protein |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> = phosphatgepufferte Kochsalzlösung |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> = Polymerase Kettenreaktion |
| PKA | <i>Proteinkinase A</i> |
| PLB | <i>Passive Lysis Buffer</i> = passiver Lysepuffer |
| PLC | Phospholipase C (PLC) |
| pre-mRNA | <i>precursor messenger ribonucleic acid</i> = Vorläufer Boten-Ribonukleinsäure |
| PutP | <i>Na⁺/proline transporter</i> von <i>Escherichia coli</i> |
| R | Purinbasen Adenin oder Guanin |
| RBC Lysis Solution | Red Blood Cell Lysis Solution |
| ReO ₄ ⁻ | Perrhenat |
| RHCglo | <i>RHCglo Splicing Reporter Plasmid</i> |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure |
| <i>RNase A</i> | <i>Ribonuklease A</i> |
| rpm | <i>rounds per minute</i> = Umdrehungen/min |
| RRM | <i>RNA recognition motif</i> |
| RT | Reverse Transkription |
| RTH | <i>Resistance to Thyroid Hormone</i> – Schilddrüsenhormonresistenz |
| rT ₃ | reverses Triiodthyronin |
| s | Sekunde/n |
| SAP | <i>shrimp alkaline phosphatase</i> |
| SCN ⁻ | Thiocyanat |
| SeCN ⁻ | Selenocyanat |
| SGLT1 (SLC5A1) | Na ⁺ /Galaktose Cotransporter 1, Solute carrier Family 5 Member 1 |
| SGLT3 (SLC5A4) | Na ⁺ /Galaktose Cotransporter 3, Solute carrier Family 5 Member 4 |
| <i>SLC5A5-Gen</i> | <i>Solute Carrier Family 5 Member 5</i> – Gen |

| | |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| SLC26A4 (PDS) | Solute carrier Family 26 Member 4, PDS, Pendrin |
| SLC26A7 | |
| SMVT (SLC5A6) | <i>Sodium-dependent multivitamin transporter</i> , Solute carrier Family 5 Member 6 |
| SR-Protein | <i>serine and arginine rich protein</i> |
| SS | Spleißstelle |
| T | Thymin |
| T ₃ | Triiodthyronin |
| T ₄ | Tetraiodthyronin = Thyroxin |
| TBE | Tris-Borsäure-EDTA |
| TBE-Puffer | TRIS(Tris-aminomethan)-Borat-EDTA-Puffer |
| TcO ₄ ⁻ | Pertechnetat |
| Tg (TG) | Thyreoglobulin |
| TMS | Transmembransegmente |
| TPO | <i>Thyreoperoxidase</i> |
| TRE | <i>Thyroid Hormone Response Elements</i> |
| TRH | Thyreotropin <i>releasing</i> Hormon |
| TSH | Thyroidea-stimulierendes Hormon = Thyreotropin |
| TSHR | TSH-Rezeptor |
| U | Uracil |
| V | Volt |
| vSGLT | Na ⁺ /Galactose Cotransporter des <i>Vibrio parahaemolyticus</i> |
| wt | Wildtyp |
| x | Mal/Anzahl |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid |
| μg | Mikrogramm |
| μl | Mikroliter |
| μM | Mikromolar |
| Y | Pyrimidinbasen Thymin oder Cytosin |

Tabellen- und Bilderverzeichnis

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Abbildung 1 Schilddrüsenentwicklung</i> | 14 |
| <i>Abbildung 2 Morphologie der Schilddrüse</i> | 15 |
| <i>Abbildung 3 Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse und Einflussfaktoren auf Synthese, Sekretion und Metabolismus der Schilddrüsenhormone</i> | 18 |
| <i>Abbildung 4 Schilddrüsenhormonbiosynthese und die Regulation durch TSH</i> | 21 |
| <i>Abbildung 5 Struktur der Schilddrüsenhormone</i> | 23 |
| <i>Abbildung 6 Aktivierung der Zielzelle durch Schilddrüsenhormone</i> | 24 |
| <i>Abbildung 7 NIS Expression in verschiedenen Geweben und dessen Regulation</i> ... | 31 |
| <i>Abbildung 8 NIS Sekundärstruktur Schema mit Sequenzangabe der Transmembransegmente</i> | 33 |
| <i>Abbildung 9 Sekundärstruktur NIS Protein</i> | 34 |
| <i>Abbildung 10 Sequencher Analyse des Exon 6 des NIS-Gens der Patientin 1 (07/14)</i> | 36 |
| <i>Abbildung 11 In silico-Analyse c.743T>C, p.V248A</i> | 37 |
| <i>Abbildung 12 Sequencher Analyse des Exon 8 und Intron 8 des NIS-Gens der Patientin 2 (25/14), deren Schwester (24/14), sowie deren Mutter (49/15) und Vater (50/15)</i> | 38 |
| <i>Abbildung 13 In silico-Analyse der Mutation c.1058+5G>C</i> | 39 |
| <i>Abbildung 14 RHCglo-Splicing-Reporterplasmid</i> | 42 |
| <i>Abbildung 15 pGem®-T Vektor und Sequenz Referenzpunkte von Promega</i> | 43 |
| <i>Abbildung 16 Long Range PCR Ergebnis und Schema der untersuchten Genabschnitte</i> | 60 |
| <i>Abbildung 17 Plasmid-Gelelektrophorese</i> | 61 |
| <i>Abbildung 18 cDNA-PCR nach RT</i> | 62 |
| <i>Abbildung 19 Schema prä-mRNA NIS Exon 5-7 und Spleißprodukte</i> | 63 |
| <i>Abbildung 20 Sequenz Spleißprodukt NIS 5-7 Mutation c.743T>C, p.V248A</i> | 64 |
| <i>Abbildung 21 Schema prä-mRNA NIS Exon 7-10 und Spleißprodukte</i> | 64 |
| <i>Abbildung 22 Sequenz längeres Spleißprodukt NIS 7-10 Mutation c.1058+5G>C</i> ... | 66 |
| <i>Abbildung 23 Sequenz kürzeres Spleißprodukt NIS 7-10 Mutation c.1058+5G>C</i> ... | 66 |
| <i>Abbildung 24 Intron mit Spleißstellen</i> | 67 |
| <i>Abbildung 25 Die katalytischen Schritte der Spleißreaktion</i> | 68 |
| <i>Abbildung 26 Major Spleißosom und Spleißvorgang</i> | 70 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Abbildung 27 Schema alternativer Spleißformen der RNA</i> | 72 |
| <i>Abbildung 28 Einfluss der Spleiß Enhancer und Silencer auf das Spleißen</i> | 73 |
| <i>Abbildung 29 Nonsense-mediated decay</i> | 76 |
| <i>Abbildung 30 Dreidimensionales NIS Homologiemodell</i> | 81 |
| <i>Abbildung 31 Aminosäuren Valin und Alanin</i> | 82 |
| <i>Abbildung 32 NIS-Gen mit Lokalisation der Exons und deren codierten Segmenten des NIS-Proteins und Position der hier beschriebenen Mutationen, sowie weitere bereits bekannte Mutationen</i> | 84 |
| <i>Abbildung 33 Experimentell getestetes NIS-Sekundärstrukturmodell mit einigen der bekannten Mutationen</i> | 87 |
| <i>Abbildung 34 CRISPR/CAS 9 System</i> | 94 |
| | |
| <i>Tabelle 1 PCR-Ansatz nach Expand™ High Fidelity PCR System</i> | 46 |
| <i>Tabelle 2 Cyclerprogramm für Expand™ High Fidelity PCR System</i> | 46 |
| <i>Tabelle 3 PCR-Ansatz nach QIAGEN® LongRange PCR Kit</i> | 47 |
| <i>Tabelle 4 Cyclerprogramm für QIAGEN® LongRange PCR Kit</i> | 47 |
| <i>Tabelle 5 Cyclerprogramm für Sequenzierung</i> | 53 |
| <i>Tabelle 6 Reverse Transkription nach Promega Kit</i> | 56 |
| <i>Tabelle 7 PCR-Ansatz mit cDNA nach reverser Transkription</i> | 57 |
| <i>Tabelle 8 Cyclerprogramm für cDNA PCR</i> | 57 |
| <i>Tabelle 9 Cyclerprogramm für Sequenzierung der RT cDNA</i> | 58 |

1. Einleitung

Diese Arbeit untersucht die *in vitro* Charakterisierung der Auswirkung von zwei Mutationen im *SLC5A5*-Gen auf das Spleißen. Ausschlaggebend für den Beginn der Arbeit war eine genetische Untersuchung mehrerer Patienten mit vermutetem Schilddrüsenhormon-biosynthesedefekt bei angeborener Hypothyreose. Hierbei zeigten sich bis dato noch nicht beschriebene Mutationen im *SLC5A5*-Gen.

Bei der 1. Patientin handelt es sich um ein zum Zeitpunkt der Untersuchung neun Jahre altes Mädchen, mit angeborener Hypothyreose. Bei ihr zeigte sich eine heterozygote Mutation an Position c.743T>C, p.V248A im 6. Exon des *SLC5A5*-Gens.

Die beiden weiteren Patienten sind zwei Schwestern, bei denen im Alter von zwei und elf Jahren die identische homozygote Mutation c.1058+5G>C im Bereich der Spleiß-Donorstelle nach dem 8. Exons des *SLC5A5*-Gens nachgewiesen wurde. Die Eltern sind heterozygote Träger derselben Mutation und blutsverwandt.

Bei dem untersuchten Gen handelt es sich um das *SLC5A5*-Gen, das den Natrium-Iodid-Symporter codiert. Es befindet sich auf Chromosom 19 und besteht aus 15 Exons, welche für ein Protein aus 643 Aminosäuren und 13 Transmembransegmenten kodieren.

Der Natrium-Iodid-Symporter, auch Natrium-Iodid-Cotransporter genannt, ist ein Transportprotein der Zellmembran und für den Transport von Iodid-Ionen aus dem Blut in die Zelle verantwortlich. Er befindet sich hauptsächlich in der Membran von Schilddrüsenfollikelzellen. Durch seine basolaterale Lokalisation in den Schilddrüsenfollikelzellen ist NIS für die Aufnahme der Iodid-Ionen in die Zelle verantwortlich, was den ersten Schritt der Schilddrüsenhormonsynthese darstellt. Er transportiert jeweils zwei Natrium Kationen mit einem Iodid Anion. Dabei wird der durch die *Na⁺-K⁺-ATPase* einwärts gerichtete *Na⁺*-Konzentrationsgradient genutzt, um das Iodid auf das 30-50 fache der extrazellulären Konzentration zu konzentrieren und für die Schilddrüsenhormonsynthese bereitzustellen.

Die Genexpression und Transkription des *NIS* Gens wird durch TSH über einen cAMP-abhängigen Signalweg geregelt. Da die transkribierte prä-mRNA zuerst gespleißt werden muss, um die reife mRNA zu erhalten, sind die Abschnitte der DNA

entscheidend, die Bindungsstellen für verschiedene Proteine enthalten, die zum Spleißen notwendig sind. Besonders wichtig sind hierbei die sogenannten Spleiß-Donor- und Spleiß-Akzeptorstellen am Anfang und Ende jedes Exons. Befindet sich an diesen hochkonservierten Sequenzen eine Mutation, kann das Bindungsverhalten der Spleißproteine und somit auch das Spleißen selbst verändert werden.

Durchgeführte *in silico*-Analysen ergaben Hinweise auf eine mögliche Veränderung der Bindekapazität verschiedener Spleißproteinfamilien durch die hier identifizierten Mutationen. Ist die Bindekapazität der Spleißproteine alteriert, kann dies zur Veränderung des Spleißens und somit zu einer veränderten Exon-Intron-Abfolge führen, die wiederum zu einem fehlerhaften Protein führen kann.

Das Ziel dieser Arbeit ist, zu untersuchen, ob die in zwei Patienten identifizierten *NIS* Mutationen Einfluss auf das Spleißverhalten *in vitro* haben und somit möglicherweise zu einer veränderten RNA führen. Dazu werden die genomischen Genabschnitte, inklusive der flankierenden Exons, in einen Spleißvektor (RHCglo) kloniert und dann letztendlich in HeLa-Zellen transfiziert. Die von den Zellen transkribierte und gespleißte RNA wird extrahiert und auf mögliche Veränderungen hin untersucht. Damit soll herausgefunden werden, ob der Natrium-Iod-Symporter durch die Mutation in seiner Struktur oder Funktion eingeschränkt, und deshalb eine Ursache für die angeborene Hypothyreose dieser Patienten sein kann.

2. Literaturdiskussion

2.1. Schilddrüsenentwicklung

Die Schilddrüse beginnt bereits in der frühen Embryonalphase sich zu entwickeln. Sie ist die erste Hormondrüse die sich entwickelt und entsteht aus zwei Hauptstrukturen, dem primitiven Pharynx und der Neuralspalte. Der Hauptanteil bildet sich aus dem primitiven Pharynxboden (s. Abb 1). Zwischen dem 20. und 22. Tag nach der Befruchtung erfolgt die Spezialisierung einiger endodermaler Epithelzellen des Pharynxbodens, die um den 24. Tag ausknospen. Die Ausknospungsstelle ist als Foramen coecum vor dem hinteren Drittel der Zunge bekannt. Außerdem wandern in die Schilddrüsenanlage noch Zellen aus der fünften Schlundtasche ein, die ursprünglich aus der Neuralleiste stammen und aus denen sich die C-Zellen (s. Kap. 2.2., Abb. 2 B) entwickeln. (Zapanta & Shokri, 2019; Portulano, et al., 2014; Benninghoff & Drenckhahn, 2004)

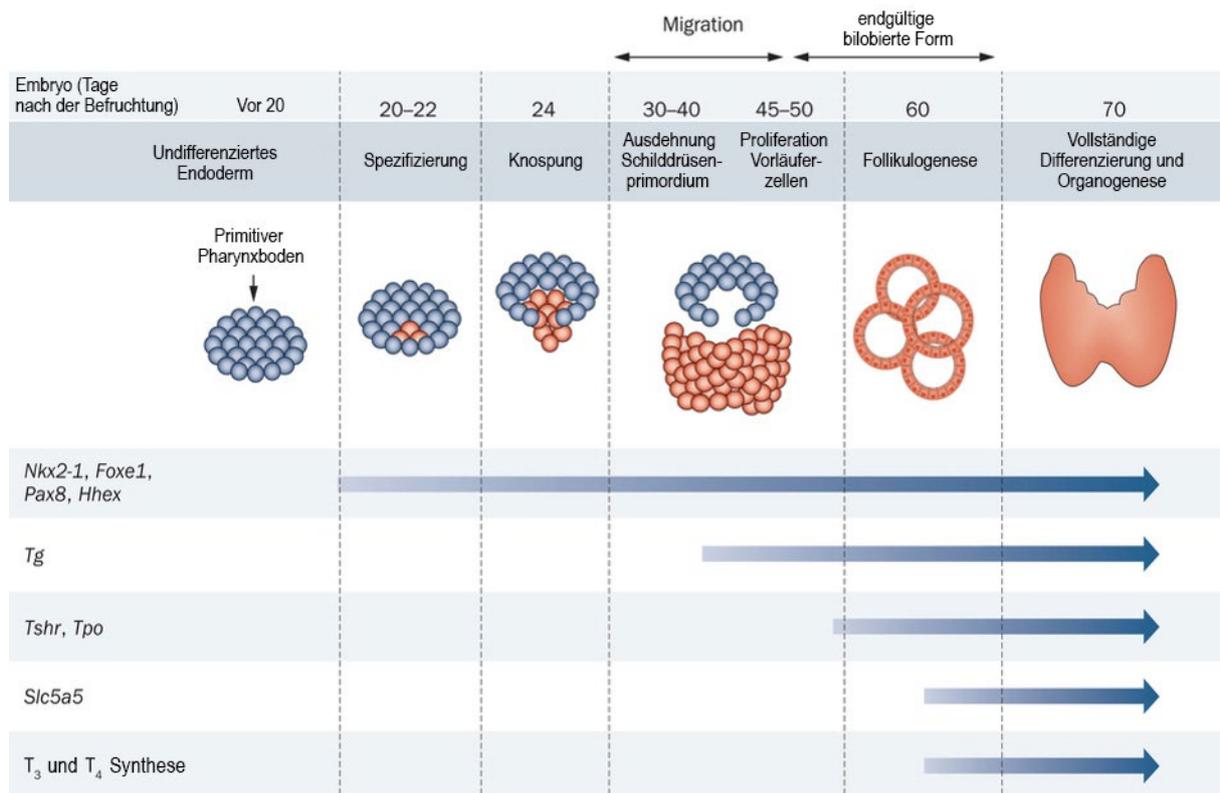


Abbildung 1 Schilddrüsenentwicklung

Zeitlicher Verlauf der Entwicklung der Schilddrüse in den ersten 70 Tagen nach Befruchtung und Reihenfolge des Beginns der Expression verschiedener, für die Schilddrüsenhormonproduktion relevanter Gene. Die Schilddrüse formt sich aus Zellen des primitiven Pharynxbodens. Zum Zeitpunkt der Spezialisierung und Ausknospung können die Expression des *Nkx2-1*-Gens (NK2 Homeobox 1, *Thyroid Transcription Factor 1*, codiert das Thyroid-Specific Enhancer-Binding Protein), *Foxe1*-Gens (*Forkhead Box E1*, *Thyroid Transcription Factor 2*), *Pax8*-Gens (codiert das *Paired Box Protein Pax-8*) und *Hhex*-Gens (codiert das *Hematopoietically-Expressed Homeobox Protein*) nachgewiesen werden.

Im Verlauf der Migration wird das *TG*-Gen exprimiert, welches das Protein Thyreoglobulin codiert. Zu Beginn der Folliculogenese findet sich um den 60. Tag nach Befruchtung die Expression des *TSHR*-Gens (kodierend für den Thyroidea-stimulierenden-Hormon-Rezeptor) und des *TPO*-Gens (kodierend für die *Thyroid Peroxidase*). Zwischen dem 60. und 70. Tag lässt sich die Expression des *SLC5A5*-Gens, das den Natrium-Iodid-Symporter codiert, zum ersten Mal nachweisen. Zeitgleich beginnt die Schilddrüsenhormonbiosynthese und sowohl Triiodthyronin (T_3) als auch Tetraiodthyronin (T_4) können als Syntheseprodukte nachgewiesen werden. (mod. nach (Fernández, et al., 2014))

Die Schilddrüsenvorläuferzellen beginnen als eine einfache Verdickung der Mittellinie, formen in der weiteren Entwicklung das Schilddrüsendivertikel und migrieren kaudalwärts in Richtung ihres Bestimmungsortes kaudal und ventral des Schildknorpels, direkt vor der Trachea (Tag 30-45, s. Abb. 1 und 2 A). Diese Struktur ist initial hohl und bildet proximal den Ductus thyreoglossus. Im Verlauf wird sie solider und bildet distal zwei Lappen, die durch einen Isthmus verbunden sind (s. Abb. 2 A). Im weiteren Verlauf bildet sich der Ductus thyreoglossus zurück. Erfolgt eine unvollständige Zurückbildung kann sich im Verlauf des Ductus thyreoglossus ektopes Schilddrüsenewebe bilden. Erfolgt die unvollständige Zurückbildung im distalen Anteil des Ductus thyreoglossus bildet sich ein Pyramidallappen oberhalb des Isthmus (s. Abb. 2 A). (Zapanta & Shokri, 2019; Portulano, et al., 2014; Szinnai, et al., 2007; Benninghoff & Drenckhahn, 2004)

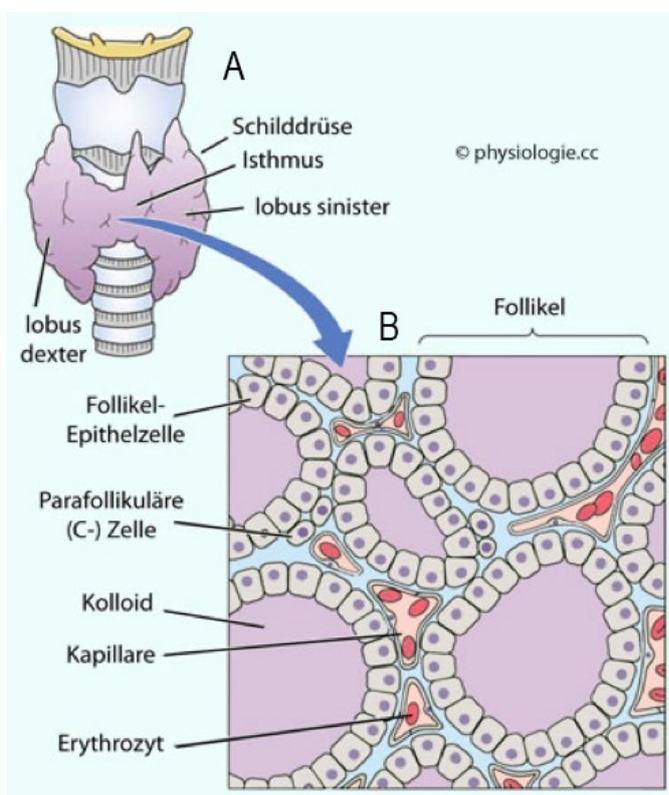


Abbildung 2 Morphologie der Schilddrüse

A Lokalisation der Schilddrüse ventral der Trachea mit dem rechten (lobus dexter) und linken (lobus sinister) Schilddrüsenlappen, sowie dem Isthmus mit Pyramidallappen. B Follikel der Schilddrüse mit Follikelepithelzellen, welche das Kolloid (lila) umschließen und das umgebende Bindegewebe (blau) mit den darin enthaltenen Parafollikulären (C-)Zellen (Kalzitinin produzierend) und Kapillaren (orange) mit Erythrozyten (rot), Modifiziert nach (Hinghofer-Szalkay, 2021) und (Boron & Boulpaep, 2020).

Zwischen dem 45. und 50. Tag nach Befruchtung proliferieren die Schilddrüsen-vorläuferzellen und um den 60. Tag bilden sich die Schilddrüsenfollikel. Hierzu umschließen die Follikelepithelzellen, auch Thyreozyten genannt, einschichtig den Innenraum (Lumen) der Follikel (s. Abb. 2 B). Im Follikellumen befinden sich eine trüb glasige, gelatinös bis zähe Masse, die als Kolloid bezeichnet wird und die Vorstufe der Schilddrüsenhormone, das Protein Thyreoglobulin enthält. Zwischen den Epithelzellen liegen die parafollikulären C-Zellen verteilt, jedoch ohne das Follikellumen zu berühren (s. Abb. 2 B). Um die Follikel selbst wird ein dichtes Kapillarnetz aus Blut- und Lymphgefäßen sowie retikulären Fasern ausgebildet. Zwischen dem 60. und 70. Tag lässt sich die Expression des *SLC5A5*-Gens, das den Natrium-Iodid-Symporter codiert, zum ersten Mal nachweisen (s. Abb. 1). Zeitgleich beginnt die Schilddrüsenhormonbiosynthese und sowohl Triiodthyronin (T_3) als auch Tetraiodthyronin (T_4) können als Syntheseprodukte nachgewiesen werden. Etwa am 70. Tag nach Befruchtung ist die vollständige Differenzierung und Organogenese abgeschlossen (s. Abb. 1). Die Schilddrüse ist nun von einer Bindegewebskapsel umgeben und durch Bindegewebssepten in verschiedene Läppchen aufgeteilt, die jeweils aus mehreren Follikeln bestehen. Ist die Schilddrüse zu klein angelegt spricht man von einer Schilddrüsenhypoplasie, fehlt die Schilddrüse komplett besteht eine Schilddrüsenaplasie. (Hall & Hall, 2020; Fernández, et al., 2014; Portulano, et al., 2014; Szinnai, et al., 2007; A. Benninghoff, 2004; Lüllmann-Rauch, 2003)

2.2. Funktion der Schilddrüse

Die Schilddrüse ist eine der größten endokrinen Drüsen des menschlichen Körpers und wiegt beim Erwachsenen ca. 15-20g. Die Hauptaufgabe der Schilddrüse ist die Produktion und Speicherung der Schilddrüsenhormone Triiodthyronin (T_3) und Tetraiodthyronin (T_4 , Thyroxin) in den Follikelzellen, sowie deren Freisetzung in die Blutbahn. Hierdurch steuern sie den Grundumsatz und Stoffwechsel des Körpers. Die Menge der im Kolloid gespeicherten Hormone reicht in der Regel aus, um den Körper eines gesunden Menschen für etwa drei Monate zu versorgen. Ein komplettes Fehlen

der Schilddrüsenhormone führt zu einem Sinken des metabolischen Grundumsatzes um 40-50%. Besonders signifikant ist eine sogenannte Hypothyreose während der frühkindlichen Entwicklung, da diese unerkannt v.a. zu vermindertem Wachstum und starken, vermeidbaren kognitiven Einschränkungen führt (s. Kap. 2.6.). Im Falle einer exzessiven Hormonproduktion (Hyperthyreose) kann der Grundumsatz um 60-100% gesteigert werden, was ebenfalls gesundheitliche Beeinträchtigungen verursacht (s. Kap. 2.6.), da die Schilddrüsenhormone im Körper die verschiedensten Prozesse steuern (s. Kap. 2.5.). (Hall & Hall, 2020; Boron & Boulpaep, 2016)

Zusätzlich produziert die Schilddrüse auch noch Kalzitinin in den C-Zellen (s. Abb. 2, B), das an der Regulation des Kalzium- und Phosphathaushaltes des Körpers beteiligt ist (Hall & Hall, 2020).

Da die Schilddrüsenhormone eine signifikante Rolle im Stoffwechsel des Körpers spielen, ist die Regulierung ihrer Produktion und Freisetzung durch die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse fein abgestimmt und wird durch verschiedene, im folgenden Kapitel näher betrachtete Faktoren beeinflusst.

2.3. Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse

Im Hypothalamus wird das Thyreotropin-releasing hormone (TRH) durch die Neurone des Nucleus paraventricularis gebildet und an der Eminentia mediana in den primären hypothalamo-hypophysären Pfortaderkreislauf (Primärplexus) abgegeben. Durch diesen gelangt das TRH zum Hypophysenvorderlappen und bindet dort an den TRH-Rezeptor der Zellmembran der Hypophysenzellen. Hierdurch wird das Phospholipase C (PLC) Second Messenger System mit Inositoltrisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG), sowie Kalziumionen, aktiviert, welches letztendlich zur gesteigerten Ausschüttung von TSH (Thyreoida-stimulierendes Hormon), auch bekannt als Thyreotropin, führt (s. Abb. 3). (Hall & Hall, 2020)

Über die Blutbahn gelangt TSH zur Schilddrüse und stimuliert durch Bindung an den G-protein-gekoppelten-TSH-Rezeptor die Schilddrüse zur Hormonbiosynthese und Sekretion. TSH initiiert außer der Synthese auch die Endozytose und Proteolyse des Thyreoglobulins und somit die Freisetzung der Schilddrüsenhormone in die

Blutlaufbahn. Zudem stimuliert TSH alle Schritte der Hormonsynthese (s. Kap. 2.4 und Abb. 4). Die Iodaufnahme wird durch die Erhöhung der Aktivität des Natrium-Iod-Symporters (s. Kap. 2.7.) gesteigert. Ebenso erhöht TSH die Iodierung der Tyrosinreste und die Expression verschiedener Gene im Schilddrüsengewebe (z.B. des *TPO*-Gens für die *Thyroid Peroxidase* und des *NIS*-Gens), deren Transkriptionsprodukte zur Hormonbiosynthese benötigt werden. Außerdem stimuliert TSH auch das Wachstum und die Vaskularisierung der Schilddrüse (s. Abb. 4). (Hall & Hall, 2020)

Damit die Konzentration der Schilddrüsenhormone im Blut relativ konstant bleibt und bei Bedarf der Körperstoffwechsel gesteigert oder reduziert werden kann, existieren mehrere Regulationsmechanismen (s. Abb. 3).

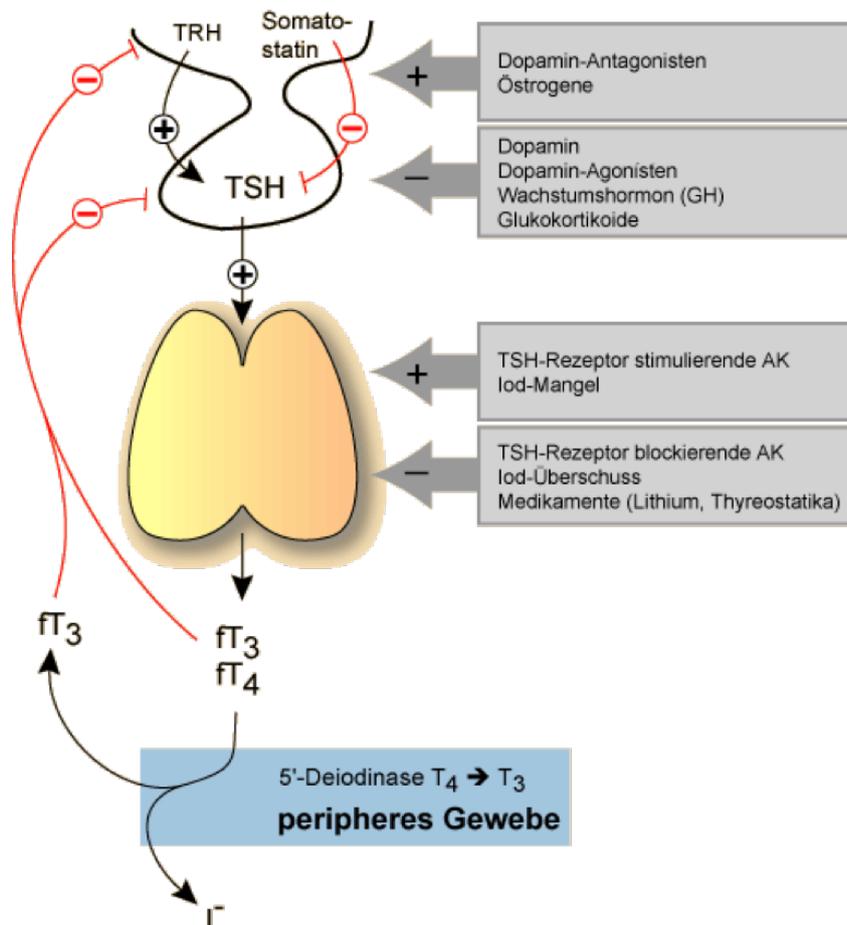


Abbildung 3 Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse und Einflussfaktoren auf Synthese, Sekretion und Metabolismus der Schilddrüsenhormone

Im Hypothalamus produziertes TRH (*Thyreotropin-releasing hormone*) stimuliert die TSH (Thyreostimulierendes Hormon) Sekretion in der Hypophyse. Ebenso stimulieren Dopamin-Antagonisten und Östrogene die TSH-Sekretion. Im Gegensatz dazu inhibieren Somatostatin, Dopamin mit Dopamin-Agonisten, Wachstumshormon (GH) und Glukokortikoide die TSH-Sekretion. TSH selbst führt zu einer vermehrten Schilddrüsenhormonbiosynthese in der Schilddrüse (gelbes Organ). Die

Schilddrüsenhormonbiosynthese wird auch durch TSH-Rezeptor stimulierende Antikörper (AK) und Iod-Mangel stimuliert, während TSH-Rezeptor blockierende Antikörper, ein Iod-Überschuss oder Medikamente wie Lithium und Thyreostatika diese inhibieren. Die produzierten Hormone werden in die Blutbahn abgegeben und erreichen u.a. als fT_4 (freies Thyroxin) und fT_3 (freies Thyronin) die peripheren Gewebe. Dort wandelt z.B. die 5'-Deiodinase T_4 (Thyroxin) in biologisch aktiveres T_3 (Thyronin) unter Abspaltung eines I^- (Iodid) um. fT_3 und fT_4 wiederum üben eine negative Rückkopplung auf die Hypophyse und den Hypothalamus aus und inhibieren die TRH- und TSH-Sekretion. (Anon., 2016)

So führen z.B. erhöhte Konzentrationen der Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 im Blut zu einer negativen Rückkopplung im Hypothalamus, sodass weniger TRH freigesetzt und somit weniger TSH sekretiert wird (s. Abb. 3). Ebenso erfolgt eine negative Rückkopplung am Hypophysenvorderlappen mit direktem Einfluss auf die TSH-Sekretion. Ist die Hormonkonzentration ungefähr 1,75 Mal höher als normal, führt dies letztendlich zu einer Reduktion der TSH-Sekretion unterhalb der Nachweisgrenze. Dies führt wiederum zu einer Reduktion der Schilddrüsenhormonbiosynthese. (Hall & Hall, 2020)

Eine Steigerung der Schilddrüsenhormonbiosynthese wird auch durch Kälte induziert. Dies geschieht höchstwahrscheinlich durch Aktivierung der Körpertemperaturkontrollzentren im Hypothalamus. Die erhöhten Schilddrüsenhormonlevel führen dann zu einer Erhöhung des Grundumsatzes. Nach Umzug in arktische Regionen konnten z.B. um 15-20% erhöhte Grundumsatzraten bei den betreffenden Personen nachgewiesen werden. (Hall & Hall, 2020)

Ebenfalls hat Hunger oder ein Nahrungsmangel einen Einfluss auf die Produktion der Schilddrüsenhormone. So ist bekannt, dass ein verlängertes Fasten zu erniedrigten Leptinkonzentrationen im Blutplasma führt. Hierdurch verringert sich die Aktivität der auf Leptin ansprechenden Neurone im bogenförmigen Kern des Hypothalamus, welche die Energiebilanz regulieren. Auch wird diskutiert ob die erniedrigten Leptinkonzentrationen zu einer direkten Inhibition der TRH Neurone führt. Zusammen führen diese Effekte zu einer reduzierten TRH, TSH und Schilddrüsenhormonsekretion, passend zu einem gesenkten Grundumsatz und Energiesparmodus bei Nahrungsmangel. (Hall & Hall, 2020)

Emotionen können ebenfalls die TRH- und TSH- und dadurch die Schilddrüsenhormonsekretion beeinflussen. So führt eine starke Stimulation des sympathischen Nervensystems – z.B. durch Angst oder Aufregung – zur Steigerung

des Grundumsatzes und wahrscheinlich über das Wärmekontrollzentrum zu einem raschen Abfall der TSH-Sekretion um eine zusätzliche Stimulation des Stoffwechsels zu vermeiden. (Hall & Hall, 2020)

Die TSH-Sekretion wird durch verschiedene weitere Substanzen gehemmt (s. Abb. 3). Hierzu gehören zum einen das Dopamin und das Somatostatin mit ihren entsprechenden Dopaminrezeptor-Agonisten, bzw. Somatostatin-Analoga. Dopamin ist ein Hormon und ein Neurotransmitter, das für seine Rolle im körpereigenen Belohnungssystem bekannt ist, aber auch u.a. für die Steuerung von Bewegungen und die Kontrolle der Sekretion verschiedener Hormone, u.a. TSH. Dopaminrezeptorantagonisten haben somit den gegenteiligen Effekt und stimulieren die TSH-Sekretion. Somatostatin ist ebenfalls ein Hormon und Neurotransmitter, dass sowohl im Hypothalamus als auch in verschiedenen gastrointestinalen Organen produziert wird und maßgebend für die Regulation der Verdauung und für die Inhibition der Wachstumshormonsekretion verantwortlich ist. Glukokortikoide hemmen ebenfalls die TSH-Sekretion, während Östrogene dieselbe stimulieren. (Spinas, et al., 2015)

An der Schilddrüse selbst gibt es weitere Regulationsmechanismen. Die Schilddrüsenhormonbiosynthese wird direkt durch Iod-Mangel und TSH-Rezeptor stimulierende Antikörper, sowie hohen β -HCG-Konzentrationen gesteigert (s. Abb. 3). Ein Iod-Überschuss, TSH-Rezeptor blockierende Antikörper und diverse Medikamente (z.B. Lithium und Thyreostatika s. Kap. 2.6.1.) hemmen die Schilddrüsenhormonbiosynthese (s. Abb. 3). (Spinas, et al., 2015)

2.4. Schilddrüsenhormonbiosynthese

Die Hormonbiosynthese in der Schilddrüse findet in den Follikeln der Schilddrüse statt. (s. Kap. 2.1., s. Abb. 2 B). Das Spurenelement Iod ist essentiell für die Schilddrüsenhormonbiosynthese. Im Gastrointestinaltrakt werden die Iodid Anionen (I^-) absorbiert und in die Blutbahn abgegeben. Die Iodaufnahme in die Thyreozyten erfolgt hauptsächlich durch den Natrium-Iod-Symporter (NIS) (s. Kap. 2.7.), welcher sich in der basolateralen Zellmembran befindet. Er transportiert jeweils zwei Natrium Kationen mit einem Iodid Anion. Dabei wird der durch die $Na^+K^+ATPase$ einwärts gerichtete Na^+ -Konzentrationsgradient genutzt, um das Iodid auf das 30-50 fache der

extrazellulären Konzentration zu konzentrieren und für die Schilddrüsenhormonsynthese bereitzustellen. (Boron & Boulpaep, 2020; Hall & Hall, 2020)

Die aufgenommenen Iodidionen diffundieren durch das Zytoplasma bis zur apikalen Zellmembran (s. Abb. 4). Hier findet der Iodidefflux vermittelt durch den Pendrin-Antiporter (Cl/I⁻) und den apikalen Iodidtransporter (AIT) in das Follikellumen statt. (Boron & Boulpaep, 2020; Boron & Boulpaep, 2016)

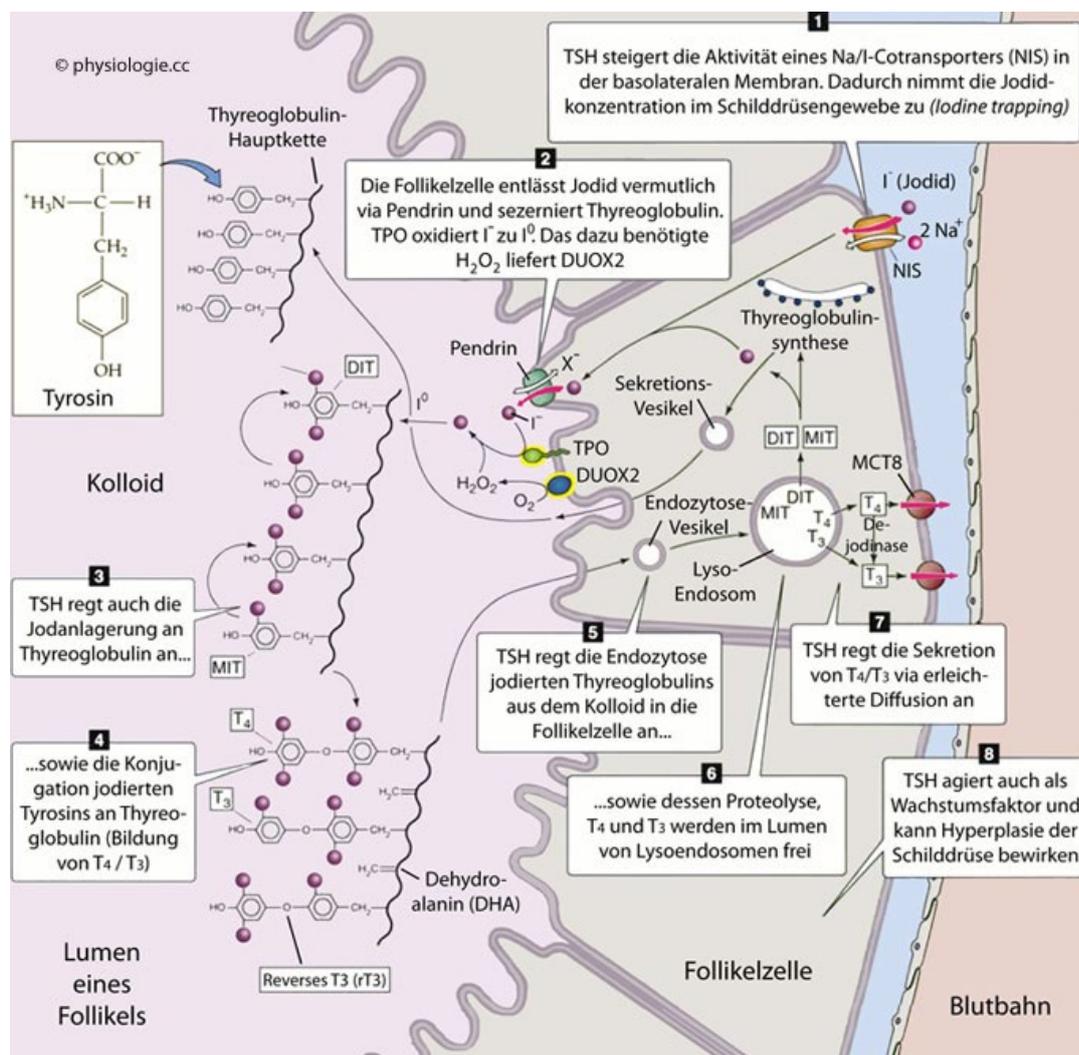


Abbildung 4 Schilddrüsenhormonsynthese und die Regulation durch TSH

In der basolateralen Membran wird Iodid via Cotransport mit Natrium durch den NIS (Natrium-Iod-Sympporter) in die Follikelzelle aufgenommen. An der apikalen Membran gelangt Iodid vermutlich via Pendrin im Austausch gegen ein anderes Anion (X⁻) ins Kolloid. Durch das Membranprotein *Thyreoperoxidase* (TPO) wird Iodid zu Iod mit Hilfe von Wasserstoffperoxid, welches durch die *DUOX2* (*Dual Oxidase 2*) bereitgestellt wird, oxidiert. Im Kolloid wird Iodid an Tyrosinreste des Thyreoglobulins gekoppelt (Iodination), wobei ein Restprodukt Dehydroalanin (DHA) entsteht, welches anscheinend für die Iodbindung an benachbartes Tyrosin eine Rolle spielt. Bei Bedarf erfolgt eine Endozytose der Thyreoglobulinkomplexe. Diese werden in Lysoendosomen abgebaut, wobei MIT (Mono-Iod-Thyronin), DIT (Diodthyronin), rT₃, T₃ und T₄ entstehen. Über den spezifischen Transporter MCT8 (*monocarboxylate transporter 8*) an der basolateralen Membran gelangen T₃ und T₄ gelangen dann in das Interstitium und die Blutbahn. (Hinghofer-Szalkay, 2021) modifiziert aus (Boron & Boulpaep, 2020).

In den Thyreozyten wird Thyreoglobulin (Tg) im rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, ein Glykoprotein bestehend aus einem Aminosäurenrückgrad mit ca. 100 Tyrosylenden, allerdings können nur ca. 20 davon iodiert werden. Durch den Sekretionsweg der Exozytose wird Tg in das Kolloid des Follikelvolumens sekretiert. Tg ist ein sehr großes Protein (>600 kDa) und ist für ca. die Hälfte des Proteingehalts in der Schilddrüse verantwortlich. Thyreoglobulin ist der Hauptbestandteil des Kolloids und sowohl Bildungs- als auch Speicherort der Schilddrüsenhormone. (Boron & Boulpaep, 2016)

Die Sekretionsvesikel mit dem Tg transportieren ebenfalls das integrale Membranprotein und Enzym *Thyroidperoxidase* (TPO), dessen Katalysator-domäne in das Vesikelvolumen ragt. Bei der Fusionierung des Vesikels mit der apikalen Zellmembran, zeigt diese Richtung Follikellumen und katalysiert die Oxidation von Iodid (I^-) zu Iod (I^0). Hierzu wird Wasserstoffperoxid (H_2O_2) benötigt, welches durch das apikale Membranprotein und Enzym *Dual-Oxidase 2* (DUOX2) bereitgestellt wird (s. Abb. 4). (Boron & Boulpaep, 2020; Boron & Boulpaep, 2016)

Das sehr reaktive Iod iodiert spezifische Tyrosylreste des Thyreoglobulins und bildet hierbei die inaktiven Vorstufen der Schilddrüsenhormone 3-Moniodtyrosin (MIT) und 3,5'-Diiodyrosin (DIT). Diese iodierten Tyrosylreste konjugieren unter Katalysation durch TPO und H_2O_2 mit benachbarten iodierten Tyrosylresten und bilden aus einem MIT- und einem DIT-Molekül Triiodthyronin (T_3) oder reverses T_3 (rT_3) und aus zwei DIT-Molekülen Tetraiodthyronin (T_4) (s. Abb. 5). Das rT_3 hat keine bekannte biologische Aktivität. Da jedoch nur wenige Tyrosylreste iodiert und konjugiert werden, ist es möglich, dass eine spezifische Struktur des Tg in der Nähe dieser Tyrosylreste sowohl die Iodierung als auch die Konjugation begünstigt. (Boron & Boulpaep, 2020; Boron & Boulpaep, 2016)

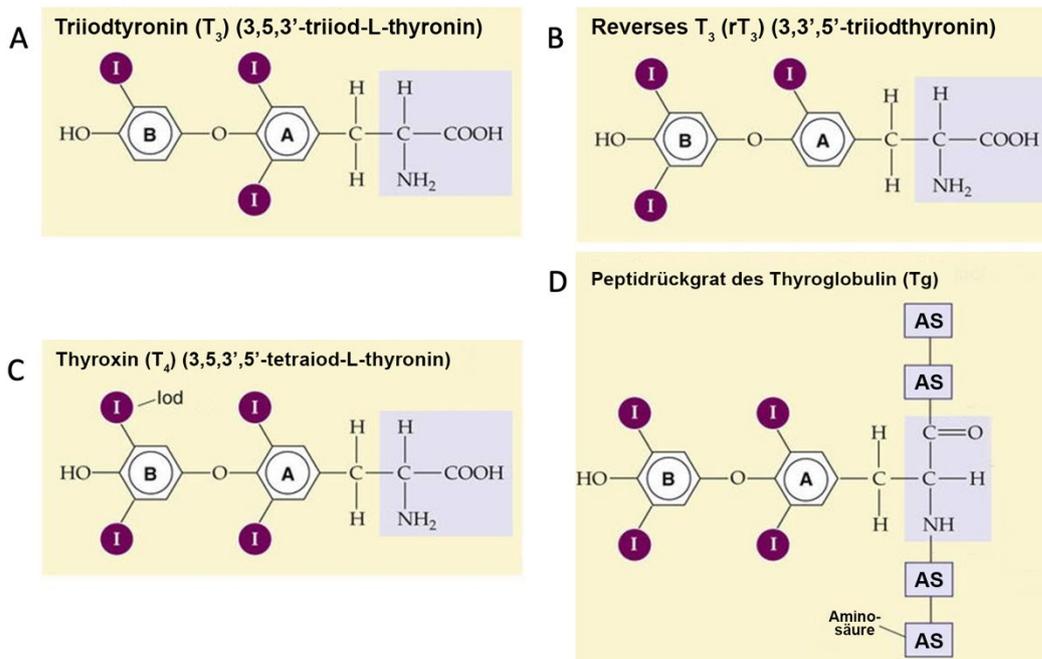


Abbildung 5 Struktur der Schilddrüsenhormone

A Struktur von Triiodthyronin (T₃) (3,5,3'-Triiod-L-thyronin)

B reverses Triiodthyronin (rT₃) (3,3',5'-Triiodthyronin)

C Thyroxin (T₄) (3,5,3',5'-Tetraiod-L-thyronin)

D Peptidrückgrat des Thyroglobulins mit einem Thyroxinmolekül.

Roter Pfeil = Schnittstellen der Hydrolyse im Lysoendosom zur Freisetzung des Thyroxins.

AA = Aminosäure

I = Iod

modifiziert nach (Boron & Boulpaep, 2016)

T₃ und T₄ sind weiterhin an das Thyreoglobulin gebunden und können somit im Kolloid gespeichert werden. Bei Bedarf wird das iodinierte Tg durch Endozytose apikal internalisiert. Auf dem Weg zur basolateralen Membran fusioniert das Endozytosevesikel mit Lysosomen und bildet ein Lysoendosom. Durch lysosomale Hydrolyse des Tgs werden sowohl T₄, T₃, rT₃, als auch MIT und DIT abgespalten. Nahe der basolateralen Membran setzt das Vesikel T₃ und T₄ frei und diese gelangen dann via den Monocarboxylat-Transporter (MCT) 8 (s. Abb. 4) in die Blutbahn. Es wird diskutiert, dass auch MCT 10 eine Rolle spielen könnte. T₄ kann vor der Freisetzung schon von einer *Deiodinase* in T₃ umgewandelt werden. Von den synthetisierten Schilddrüsenhormonen werden ca. 90% als T₄ freigesetzt, 10% als T₃ und <5% als rT₃. Das biologisch inaktivere T₄ wird dann in den peripheren Organen wie z.B. Leber oder Nieren in das aktivere T₃ durch *Deiodinasen* umgewandelt. Insgesamt wurde ca. $\frac{3}{4}$ des zirkulierenden T₃ peripher umgewandelt. MIT und DIT werden im Thyreozyten

recycelt indem sie deiodiert werden und dadurch zum Aufbau neuer Tg-Moleküle zur Verfügung stehen. (Boron & Boulpaep, 2016)

2.5. Physiologischer Einfluss der Schilddrüsenhormone

Nach Aufnahme in die Zielzellen der Endorgane über einen Träger vermittelten und ATP abhängigen Transportprozess, binden sowohl T₃ als auch T₄ an intrazelluläre Proteine, mit einer deutlich höheren Affinität des Thyronins. Hiermit können sie auch in den Zielzellen gespeichert und je nach Bedarf verwendet werden. Ein großer Teil des Thyroxins wird intrazellulär zu T₃ deiodiert, sodass T₃ an bis zu 90% der intrazellulären Rezeptoren bindet. Der Haupteffekt der Schilddrüsenhormone in den Zielzellen wird durch die Aktivierung der Transkription verschiedenster proteinkodierender Gene erzielt. Hierzu gehören u.a. Gene, welche für die Na⁺-K⁺-ATPase, β-adrenerge Rezeptoren, Myosin Schwerketten, respiratorische und glukoneogenetische Enzyme kodieren (s. Abb. 6). Hierdurch wird in sozusagen allen Körperzellen eine große Anzahl an Strukturproteinen, Transportproteinen, Enzymen und weiteren Substanzen produziert. Dazu bindet das T₃ an den als heterodimer gekoppelten Thyroid-Hormon- und Retinoid-X-Rezeptor des *Thyroid Hormone Response Elements* (TRE) des jeweiligen Gens und aktiviert denselben und somit den Transkriptionsprozess (s. Abb. 6). (Hall & Hall, 2020; Boron & Boulpaep, 2016)

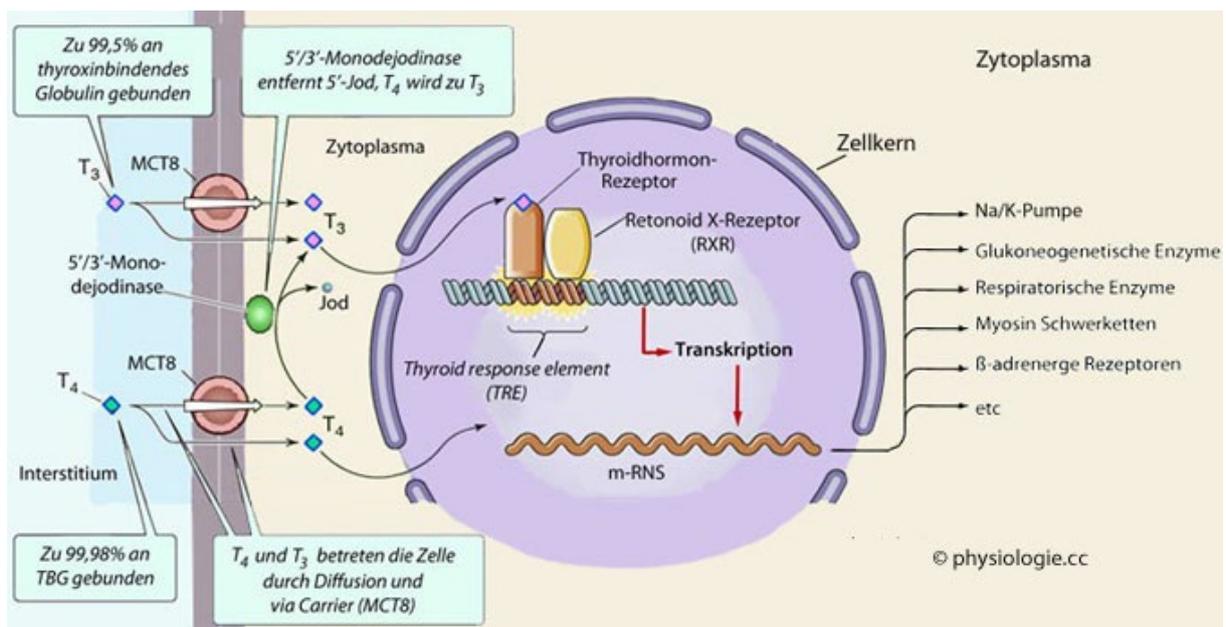


Abbildung 6 Aktivierung der Zielzelle durch Schilddrüsenhormone

Freies (ungebundenes) T₃ und T₄ betreten die Zielzelle via Diffusion oder Carrier-vermittelt über MCT8 (*Monocarboxylate transporter 8*). Im Zytoplasma wird ein Großteil des T₄ durch die 5'/3'-*Monodeiodinase* in T₃ umgewandelt, da dieses bis zu 90% stärker an die Rezeptoren bindet. Im Zellkern bindet das T₃ an den als heterodimer gekoppelten Thyroid-Hormon- und Retinoid-X-Rezeptor des *Thyroid Hormone Response Elements* (TRE) des jeweiligen Zielgens und aktiviert denselben, wodurch der Transkriptionsprozess mit Bildung von mRNA (m-RNS) gestartet wird und die Translation verschiedenster Proteine entsprechend der Zielgene erfolgt. (Hinghofer-Szalkay, 2021), modifiziert nach (Boron & Boulpaep, 2020).

Des Weiteren scheinen Schilddrüsenhormone auch andere, nicht genomische Wirkungen zu verursachen, da einige Effekte innerhalb von Minuten eintreten, zu schnell, um durch eine gesteigerte Proteinsynthese erklärt zu werden. Der Einfluss scheint an der Zellmembran, im Zytoplasma und an diversen Zellorganellen, wie z.B. Mitochondrien stattzufinden und beinhaltet unter anderem die Regulation verschiedener Ionenkanäle und oxydativer Phosphorylierung, sowie die Aktivierung intrazellulärer sekundärer Botenwege über Proteinkinasen und cAMP. (Hall & Hall, 2020; Boron & Boulpaep, 2016)

Zellulärer Stoffwechsel

Je nach Zielzelle führt dies zu unterschiedlichen Auswirkungen auf den zellulären Stoffwechsel. Im Allgemeinen steigern die Schilddrüsenhormone die Stoffwechselaktivität fast aller Körperzellen. In Tierstudien zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Anzahl und Aktivität der Mitochondrien, was zu einer gesteigerten Menge an Adenosintriphosphat (ATP) und somit zu einer erhöhten Energiereserve der Zellen führt. Außerdem steigern Schilddrüsenhormone sowohl die Durchlässigkeit der Membranen für Natriumionen als auch die Aktivität der *Na⁺-K⁺-ATPase*, sodass mehr Natrium und Kalium durch die Membranen transportiert werden. Durch den daraus resultierenden Energieverbrauch produziert der Körper mehr Wärme und kann bei einer stark erhöhten Menge an Schilddrüsenhormonen die metabolische Basalrate um 60% bis 100% steigern. Im Gegenzug wird bei einer Hypothyreose die Basalrate um bis zu 50% gesenkt. (Hall & Hall, 2020; Boron & Boulpaep, 2016)

Wachstum und Entwicklung

Da Schilddrüsenhormone einen relevanten Einfluss auf das Knochenwachstum haben, stimuliert vor allem bei Kindern eine erhöhte Menge an Schilddrüsenhormonen oft ein exzessives Längenwachstum. Da jedoch auch die Knochenreife angeregt wird, schließen sich die Epyphysenfugen oft früher und die Endgröße kann dadurch letztendlich vermindert ausfallen. Kinder mit erniedrigten oder fehlenden

Schilddrüsenhormonen zeigen eine deutliche Verlangsamung des Wachstums. Dies ist besonders ausschlaggebend für das Wachstum und die Ausreifung des Gehirns, sowohl während der Fetalperiode als auch während der ersten Lebensjahre. Ohne ausreichende Sekretion von Schilddrüsenhormonen, zeigt sich eine deutliche Verminderung des Wachstums und der Ausreifung des Gehirns. Ohne eine zeitnahe Therapie innerhalb von Tagen oder spätestens vier Wochen nach Geburt verbleiben lebenslange mentale Einschränkungen (s. Kap. 2.6.2.). (Hall & Hall, 2020; Boron & Boulpaep, 2016)

Insgesamt spielen die Schilddrüsenhormone eine signifikante Rolle in der Regulation sämtlicher Körperfunktionen. Somit erklären sich die unterschiedlichen Auswirkungen bei verschiedenen Krankheitsbildern der Schilddrüse, welche im folgenden Kapitel vorgestellt werden.

2.6. Krankheitsbilder der Schilddrüse

2.6.1. Hyperthyreose

Bei einer Schilddrüsenüberfunktion, Hyperthyreose genannt, produziert die Schilddrüse zu große Mengen von Thyroxin (T_4) und Triiodthyronin (T_3). Hierbei unterscheidet man eine primäre von einer sekundären Hyperthyreose.

Die primäre Hyperthyreose ist eine Schilddrüsenüberfunktion, die durch Störungen in der Schilddrüse selbst verursacht wird, z.B. durch Morbus Basedow oder einer Autonomie der Schilddrüse. Ist allein der TSH-Spiegel erniedrigt, spricht man von einer latenten Hyperthyreose. Im Falle einer TSH-Spiegel-Erniedrigung in Kombination mit Erhöhung der peripheren Schilddrüsenhormonkonzentrationen (fT_3 , fT_4) besteht eine manifeste Hyperthyreose.

Die sekundäre Hyperthyreose wird durch eine erhöhte TSH-Sekretion verursacht, die z.B. bei hormonbildenden Tumoren der Hypophyse auftritt. (Hall & Hall, 2020; Boron & Boulpaep, 2016)

Unabhängig davon unterscheidet man auch zwischen einer subklinischen (asymptomatischen) und einer klinischen, mit Symptomen manifestierten Hyperthyreose. Die meisten auftretenden Symptome erklären sich aus den im Kap. 2.5. näher beschriebenen physiologischen Auswirkungen der Schilddrüsenhormone.

Viele Patienten berichten über eine gesteigerte Unruhe und Nervosität mit unerklärlichem, teils starkem Gewichtsverlust trotz gesteigertem Appetit, rezidivierenden Schweißattacken, Herzrhythmusstörungen, Haarausfall und Schlafstörungen. Führt die Hyperthyreose zu einer Stoffwechsellentgleisung nennt man dies eine Thyreotoxikose, die im schlimmsten Fall tödlich verlaufen kann. (Hall & Hall, 2020)

Die Behandlung einer Hyperthyreose kann je nach Ursache entweder durch verschiedene Thyreostatika, durch eine operative Teil-/Entfernung der Schilddrüse mit zuvor appliziertem Iodid, sodass die Aktivität der Schilddrüse vor der Operation reduziert wird oder mit einer Radioiodtherapie erfolgen. Hierbei wird das radioaktive Iod über NIS in den Schilddrüsenzellen akkumuliert und führt aufgrund einer Destruktion der Zellen zu einer Reduktion der Anzahl der hormonproduzierenden Zellen. (Hall & Hall, 2020)

Weitere Auslöser einer Hyperthyreose können eine zugrundeliegende Tumorerkrankung z.B. der Hypophyse oder der Schilddrüse, Medikamente oder Antikörper gegen die Schilddrüse und ihre Strukturen sein.

2.6.2. Hypothyreose

Im Gegensatz zur Hyperthyreose werden bei einer Hypothyreose zu wenig oder keine Schilddrüsenhormone synthetisiert. Es besteht eine Schilddrüsenunterfunktion, die unbehandelt aufgrund der im Kap. 2.5. beschriebenen Wirkungen, zu extremer Erschöpfung und Schläfrigkeit, mentaler und muskulärer Trägheit, verminderter Herzaktion und Durchblutung, Verstopfung, Gewichtszunahme und weiteren Beschwerden führen kann. Zu diesen zählen die Entwicklung einer Heiserkeit und die Verringerung des Haarwachstums bis hin zum Haarausfall. Auch kann eine vermehrte Hautschuppung auftreten. Bei extrem erniedrigten Schilddrüsenhormonkonzentrationen kommt es zur Ausbildung eines Myxödems. Durch Bindung großer Mengen Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat an Proteinen im interstitiellen Raum, bekommt dieser eine gelartige Konsistenz und die Menge an interstitieller Flüssigkeit nimmt zu, was zu nicht eindrückbaren Ödemen und Gesichtsschwellungen führt.

Eine Hypothyreose kann verschiedenste Ursachen haben. (Hall & Hall, 2020; Boron & Boulpaep, 2016)

Angeborene Hypothyreose und Kretinismus

Tritt während der Fetalperiode, im Säuglingsalter oder auch später in der Kindheit eine extreme Hypothyreose auf, hat das wie im Kap. 2.5. beschrieben unbehandelt schwerwiegende Folgen auf die mentale Entwicklung und das Wachstum. Eine angeborene Hypothyreose kann durch eine Schilddrüsenanlagestörung oder aber auch durch eine Schilddrüsenhormonbiosynthesestörung entstehen. Letztere wird durch Defekte in den Genen verursacht, die für Proteine kodieren, welche für die Schilddrüsenhormonbiosynthese von Bedeutung sind (*SLC5A5* (NIS), *SLC26A4* (PDS, Pendrin), *TG*, *TPO*, *DUOX1/DUOX2*, *DUOXA2*, *IYD* (DHEAL1) und *SLC26A7*, s. Kap. 2.4. und Abb. 4) (Stoupa, et al., 2022; Hall & Hall, 2020; Kwak, 2018; Wassner, 2018). Diese Gendefekte werden autosomal rezessiv vererbt und verursachen somit bei homozygoten Mutationen und compound-heterozygoten Mutationen, wenn kein gesundes Allel vorliegt, signifikante Schilddrüsenhormonbiosynthesestörungen (Stoupa, et al., 2022; Tanase-Nakao, et al., 2018; Portulano, et al., 2014; Pohlenz, et al., 1998). Auch gibt es Fälle mit heterozygoten Mutationen in unterschiedlichen Genen, welche ebenfalls zu Schilddrüsenhormonbiosynthesestörungen führen (Stoupa, et al., 2022; Stoupa, et al., 2021; Stoupa, et al., 2020; Aycan, et al., 2017).

Ist dies der Fall, kann das Neugeborene bei Geburt noch unauffällig erscheinen, da es in der Regel durch die Mutter während der Schwangerschaft mit Schilddrüsenhormonen versorgt wurde, auch wenn dies teilweise nicht ausreichend war. Bleibt das Neugeborene unbehandelt, werden seine Bewegungen schon nach wenigen Wochen träge und die körperliche und geistige Entwicklung verzögert sich. Diese Entwicklungsverzögerung verursacht ein Krankheitsbild, dass als Kretinismus bekannt ist. Unbehandelt ist das Skelettwachstum bei diesen Kindern stärker eingeschränkt als das Wachstum der Weichteile, was zu einem disproportionalen Wachstum und den Eindruck eines übergewichtigen, stämmigen und kleinwüchsigen Kindes führt. Teilweise kann die Zunge so stark an Größe zunehmen, dass das Schlucken und die Atmung behindert wird und bis zum Erstickten führen kann. Die mentale Entwicklungsverzögerung wird durch Einschränkung im Wachstum, verringerter Ausbildung der Verästelungen und verminderter Myelinisierung der Neurone im zentralen Nervensystem verursacht. Nach Schilddrüsenhormongabe kann das Knochenwachstum sich wieder normalisieren, die mentale Entwicklung bleibt jedoch,

außer bei zeitnahen Beginn der Therapie in den ersten Lebenswochen, dauerhaft beeinträchtigt. Die Therapie besteht aus einer lebenslangen, an die Entwicklung angepasste Schilddrüsenhormonsubstitution mit L-Thyroxin. (Hall & Hall, 2020)

Hashimoto-Thyreoditis

Anders als bei den Neugeborenen wird bei älteren Kindern und Jugendlichen eine Hypothyreose oft durch eine autoimmun induzierte Thyreoditis verursacht. Im Gegensatz zum Morbus Basedow (s. Kap. 2.6.1.) wird das Schilddrüsengewebe hierbei durch eine fortschreitende Entzündung und darauffolgende Fibrose soweit zerstört, dass eine Schilddrüsenhormonbiosynthese nur noch eingeschränkt oder nicht mehr möglich ist. In einigen Fällen mit Hashimoto-Thyreoditis ist ebenfalls eine Substitution mit L-Thyroxin notwendig. (Hall & Hall, 2020)

Struma

Verschiedene Ursachen einer Hypothyreose führen häufig zu einer Schilddrüsenvergrößerung, auch Struma genannt. Eine mögliche Ursache ist leichte Thyreoditis mit hypothyreoter Stoffwechsellage. Vermehrt ausgeschüttetes TSH aufgrund fehlender Rückkopplung (s. Kap 2.3.) führt zum Wachstum der nicht von der Thyreoditis betroffenen Schilddrüsenanteile und somit, aufgrund dieses unregelmäßigen Wachstums, zu einer nodulären Struma. Andere Ursachen sind Defekte in verschiedenen Enzymen, die für die Schilddrüsenhormonbiosynthese notwendig sind (s. Kap. 2.4.). Dazu gehören Defekte der Iodaufnahme (NIS, s. Kap. 2.7.), Defekte im *Peroxidase* System mit ausbleibender Oxidierung des Iods zu Iodid, Defekte in der Kopplung der iodierten Tyrosinmoleküle im Thyreoglobulin und Defekte der *Deiodinase*, wodurch nicht gekoppelte Tyrosinmoleküle nicht mehr deiodiert werden können und somit ein Iodrecycling verhindert wird und ein Iodmangel entsteht. (Hall & Hall, 2020)

Eine weitere mögliche Ursache einer Struma ist ein länger anhaltender Iodmangel. Jedes Jahr werden ca. 50 mg Iod zur Schilddrüsenbiosynthese benötigt, jedoch gibt es Regionen (z.B. Alpen, Anden, Great Lakes in Nordamerika), in denen der Iodgehalt des Bodens zu niedrig ist, um selbst diese geringe Menge in den Nahrungsmitteln bereit zu stellen und somit traten dort vor Einführung einer Iodierung des Speisesalzes vermehrt große Strumen auf. Durch den Iodmangel werden nicht ausreichende

Schilddrüsenhormonmengen hergestellt. Durch fehlende negative Rückkopplung (s. Kap. 2.3.) werden große Mengen an TSH von der Hypophyse sekretiert. Dieses wiederum stimuliert die Schilddrüse vermehrt Thyreoglobulin zu produzieren und im Kolloid zu speichern, wodurch die Follikelvolumen kontinuierlich zunehmen und das Volumen der Schilddrüse auf bis das 10-20-fache der Normalgröße zunimmt. (Hall & Hall, 2020)

Außer durch Iodmangel kann eine Struma auch durch eine Thyreoditis mit hypothyreoter Stoffwechsellage entstehen. Vermehrt ausgeschüttetes TSH aufgrund ebenfalls fehlender Rückkopplung (s. Kap 2.3.) führt zum Wachstum der nicht von der Thyreoditis betroffenen Schilddrüsenanteile und somit aufgrund dieses unregelmäßigen Wachstums zu einer nodulären Struma. (Hall & Hall, 2020)

Eine ausreichende Iodaufnahme ist somit für die Gewährleistung der Schilddrüsenhormonbiosynthese (s. Kap. 2.4.) und zur Vermeidung der Entwicklung einer Iodmangelstruma unerlässlich. Für die Iodaufnahme in die Schilddrüse ist vor allem der Natrium-Iod-Symporter zuständig, welcher im folgenden Kapitel näher beschrieben wird.

2.7. Natrium-Iod-Symporter (NIS)

2.7.1. Funktion

Der Natrium-Iod-Symporter (NIS) ist ein integrales Membranprotein der *solute carrier family 5A* (SLC5A5), der sich in der basolateralen Zellmembran der Schilddrüsenfollikelzellen befindet (Darrouzet, et al., 2014; De la Vieja, et al., 2000). In geringeren Mengen wird er auch in Speicheldrüsen (La Perle, et al., 2013; Jhiang, et al., 1998), laktierenden Milchdrüsenzellen (Tazebay, et al., 2000), Epithelzellen der Lunge, epithelialen und parietalen Magenzellen, intestinalen Enterozyten, der Niere (Portulano, et al., 2014), der Plazenta und im Hodengewebe exprimiert (s. Abb. 7). (Darrouzet, et al., 2014; Portulano, et al., 2014; Wright & Turk, 2004; Lacroix, et al., 2001; Dai, et al., 1996)

| Gewebe | Subzelluläre Lokalisierung | Regulation |
|------------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------|
| Schilddrüse | Basolateral | TSH, I ^o , KCNQ1/KCNE2 K ⁺ Kanal |
| Speicheldrüse | Basolateral | Konstitutiv |
| Magen | Basolateral | Konstitutiv |
| Dünndarm | Apikal | I ⁻ |
| Laktierende Milchdrüse | Basolateral | β-Estradiol, Oxytocin, Prolaktin |

Abbildung 7 NIS Expression in verschiedenen Geweben und dessen Regulation

In der ersten Spalte wird das NIS exprimierende Gewebe genannt, in der zweiten Spalte dessen basolaterale oder apikale Lokalisation und in der dritten Spalte wodurch die Regulation erfolgt. TSH = Thyroidea-stimulierendes Hormon, I⁻ = Iodid, KCNQ1/KCNE2 K⁺ = *Potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1 and subfamily E member 2*, spannungsgesteuerte Kaliumkanäle der Familie Q Nr 1 und E Nr 2. Modifiziert nach (Portulano, et al., 2014)

Dieser Symporter transportiert zeitgleich zwei Natrium Kationen (Na⁺) und ein Iod Anion (I⁻) aus dem Extrazellularraum in die Zelle. Um den Translokationsmechanismus zu starten, muss zuerst eines der Natrium Ionen an die dazu vorgesehene Bindungsstelle binden (Eskandari, et al., 1997)(s. Kap. 2.7.3. und 5.3.). Der für den Transport erforderliche nach innen gerichtete Na⁺-Konzentrationsgradient wird durch die ebenfalls basolateral lokalisierte Na⁺-K⁺-ATPase erzeugt. (Darrouzet, et al., 2014; Dohan, et al., 2003; Eskandari, et al., 1997)

Anstelle des Natriums können auch Lithium Kationen (Li⁺) transportiert werden, jedoch beträgt deren Transportaktivität nur etwa 10% der Transportaktivität des Natriums. Wasserstoff Kationen (H⁺) haben beinahe keine Substrattransportfunktion (Eskandari, et al., 1997).

Außer der Iod Anionen kann NIS auch verschiedene andere Anionen transportieren, welche die Iodaufnahme in die Schilddrüse kompetitiv hemmen können. Bekannt ist unter anderem der Transport von Hypochlorid (ClO⁻), Thiocyanat (SCN⁻), Selenocyanat (SeCN⁻), Perrhenat (ReO₄⁻), Hyponitrit (NO⁻), Perchlorat (ClO₄⁻) und Pertechnetat (TcO₄⁻), welches für Szintigraphien verwendet wird. Perchlorat kann auch zur Diagnostik von Iodaufnahmestörungen in die Schilddrüsenfollikel via NIS verwendet werden. (Boron & Boulpaep, 2016; Darrouzet, et al., 2014; Portulano, et al., 2014; Van Sande, et al., 2003; Eskandari, et al., 1997)

2.7.2. Regulation

Aufgrund der tragenden Rolle des NIS in der Regulation der Schilddrüsenaktivität bedarf die Regulation der Expression des NIS einer feinen Abstimmung, sowohl auf der Transkriptionsebene als auch in den darauffolgenden Schritten bis zum Einbau in die Membran (Darrouzet, et al., 2014; Dohan, et al., 2003).

2.7.2.1. durch TSH (s. Abb. 7)

Durch die Bindung des TSH an den basolateralen TSH-Rezeptor der Schilddrüsenfollikelzellen, welcher intrazellulär an ein G Protein gekoppelt ist, erfolgt die Aktivierung des cAMPs, welches die Transkription des NIS stimuliert. Erhöhte TSH-Konzentrationen im Blut führen somit zu einer vermehrten Transkription und Expression von NIS, da TSH auch das Protein-Targeting und den Transport von NIS zur Zellmembran und dessen Einbau fördert. Außerdem wird auch die Aktivität des NIS gesteigert. (Dohan, et al., 2003; Levy, et al., 1997)

2.7.2.2. durch Iod (s. Abb. 7)

Im Gegensatz dazu verursacht eine erhöhte Iod-Konzentration im Blut eine Verringerung der NIS Expression und dessen Einbau in die Zellmembran. Zum einen geschieht dies durch den Wolff-Chaikoff Effekt, indem hohe Iod-Konzentrationen die Schilddrüsenfunktion und Hormonbiosynthese deutlich verringern. Durch die dadurch ausgelöste Reduktion der NIS mRNA und NIS Aktivität, sowohl in der Schilddrüse als auch in den Enterozyten, wird die intrazellulläre Iodaufnahme verringert und nach ca. zwei Tagen kann eine erneute Schilddrüsenhormonbiosynthese beginnen. Dies wird als Wolff-Chaikoff Escape bezeichnet. (Darrouzet, et al., 2014; Dohan, et al., 2003)

2.7.2.3. durch Kalium Kanäle (s. Abb. 7)

In mehreren Studien zeigte sich ein Einfluss der basolateralen, auswärts gerichteten KCNQ1/KCNE2 Kalium Kanäle auf die NIS Aktivität, in dem ein Fehlen oder eine verringerte Funktion dieser Kanäle eine Hypothyreose durch eine verringerte Iodaufnahme verursachte. Dies geschieht höchstwahrscheinlich durch eine Verringerung des Membranpotentials, wodurch der elektrogene Iodtransport durch NIS gestört wird. (Darrouzet, et al., 2014; Roepke, et al., 2009)

2.7.2.4. weitere Regulationsmechanismen

Je nach Gewebeart gibt es auch noch andere Regulationsmechanismen (s. Abb. 7). Besonders in den laktierenden Milchdrüsenzellen wird die NIS Expression durch das Saugen an der Brust und der Kombination der Hormone Oxytoxin, β -Estradiol und Prolaktin angeregt. (Darrouzet, et al., 2014; Tazebay, et al., 2000)

2.7.3. Genlokalisierung und Struktur

Das *SLC5A5*-Gen befindet sich auf Chromosom 19 und besteht aus insgesamt 1929 Nukleotiden in 15 Exons, welche für 643 Aminosäuren kodieren. Das NIS Protein besitzt 13 helikale Transmembransegmente (TMS) (s. Abb. 8). Hierbei kodieren die Exons unterschiedliche Anteile der Transmembransegmente (s. Abb. 30). (Darrouzet, et al., 2014; Portulano, et al., 2014; Smanik, et al., 1996; Levy, et al., 1997)

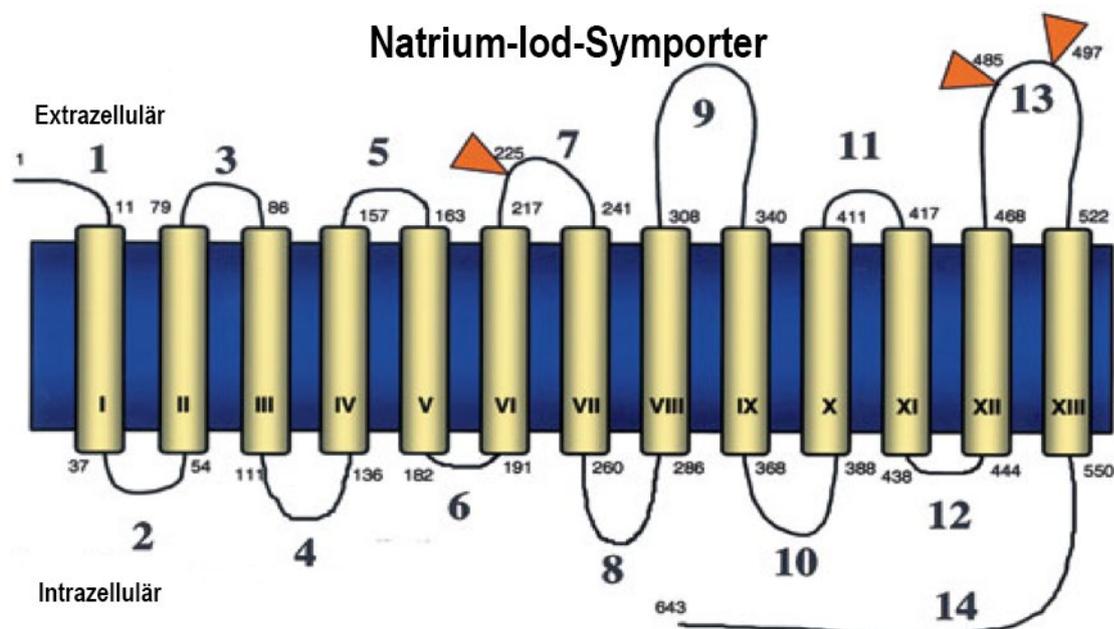


Abbildung 8 NIS Sekundärstruktur Schema mit Sequenzangabe der Transmembransegmente

Die 13 Transmembransegmente sind mit den römischen Ziffern I-XIII dargestellt und die Aminosäuresequenznummern in kleinen Zahlen angegeben. Ebenso erfolgt die Positionsangabe der Glykosylierungsstellen (orange Dreiecke) mit kleinen arabischen Zahlen. Die außerhalb der Membran liegenden Anteile des Proteins sind mit großen arabischen Ziffern gekennzeichnet. Modifiziert nach (Spitzweg & Morris, 2002).

Der N-Terminus (NH_3^+) des NIS Proteins befindet sich extrazellulär (s. Abb. 9), ein typisches Signalpeptid am N-Terminus fehlt jedoch. Im Gegensatz dazu befindet sich der C-Terminus (COO^-) intrazellulär (s. Abb. 9), bestehend aus fast 93 Aminosäuren mit multiplen möglichen Phosphorylierungs- und Bindungsstellen für regulatorische

Proteine mit, soweit bekannt, nur wenig Sekundärstruktur. (Darrouzet, et al., 2014; Spitzweg & Morris, 2002; Levy, et al., 1997)

Das NIS Protein selbst hat 3 Stickstoff verknüpfte Glykosylierungsstellen. Diese befinden sich zwischen dem 6. und 7. Transmembransegment an der Position 225 und zwischen dem 12. und 13. Transmembransegment an den Positionen 485 und 497 (s. Abb. 8 und 9). Dadurch besitzt das fertige Protein ein Molekulargewicht von ca. 80-90 kDa, wobei auch geringere Molekulargewichte gefunden wurden, höchstwahrscheinlich aufgrund einer inkompletten Glykosylierung. Die Glykosylierung selbst ist nicht notwendig für ein korrektes Targeting zur Zellmembran, jedoch trägt sie zur Stabilisierung und zur korrekten Proteinfaltung bei. (Darrouzet, et al., 2014; Spitzweg & Morris, 2002; Levy, et al., 1997)

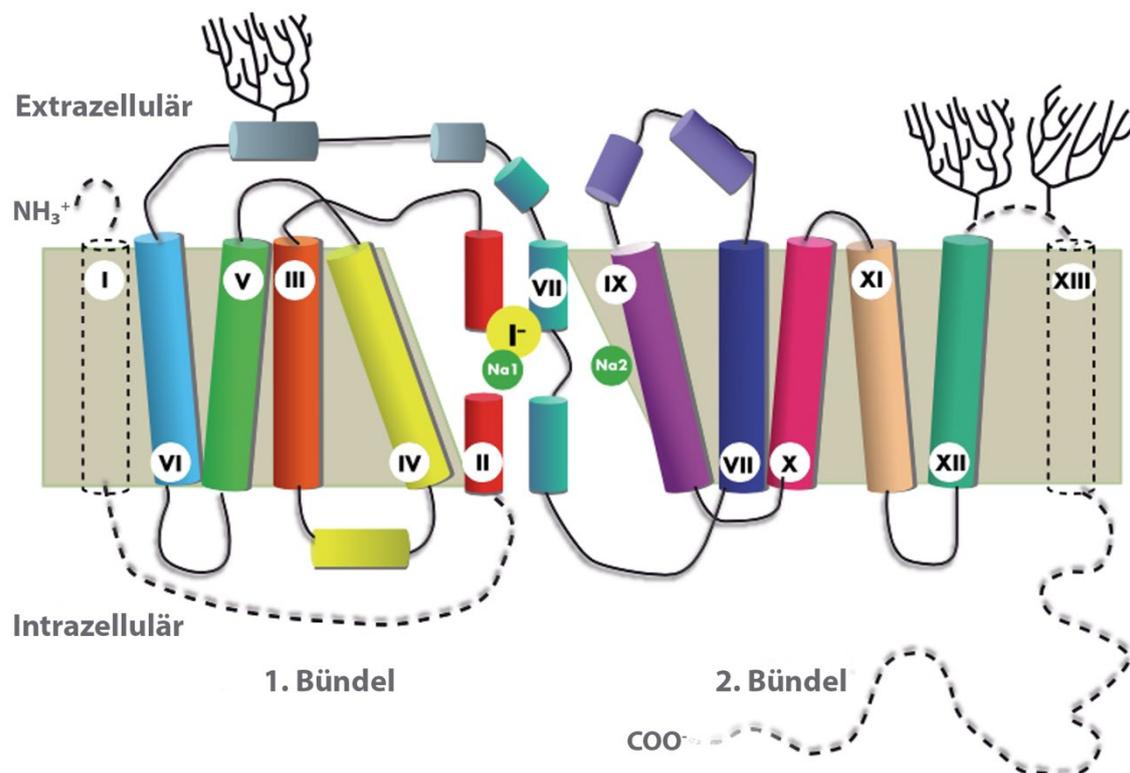


Abbildung 9 Sekundärstruktur NIS Protein

Modell anhand biochemischer Daten und bekannten dreidimensionalen Strukturen modifiziert nach (Portulano, et al., 2014). NIS-Protein mit 13 Transmembransegmenten (TMS I-XIII), wobei helikale Strukturen als Zylinder dargestellt sind. Der N-Terminus befindet sich extrazellulär, der C-Terminus intrazellulär. Zehn der dreizehn helikalen Transmembransegmente formen zwei topologisch miteinander in Bezug stehende Transmembransegmentbündel aus jeweils 5 Transmembransegmenten. Hierbei wird das 1. Bündel aus den TMS II-VI und das 2. Bündel aus den TMS VII-XI gebildet. I⁻ und Na₁ befinden sich an der Lokalisation des Substrattransportraumes, welcher durch die TMS II und VII gebildet wird. Die Koordination des Transportes des zweiten Natrium Kations (Na₂) befindet sich am TMS IX. Ungefaltete Schleifen zwischen den TMS werden als schwarze Linien dargestellt. Die TMS I und XIII, sowie die angrenzenden Schleifen werden mit gestrichelten Linien dargestellt, da deren

Lokalisation in Bezug zu den anderen TMS mit der verwendeten Methode nicht genau bestimmt werden konnte. Die 3 schwarzen Bäume zeigen die Lokalisation der Glykosylierungsstellen.

Zehn der dreizehn helikalen Transmembransegmente formen zwei topologisch miteinander in Bezug stehende Transmembransegmentbündel aus jeweils 5 Transmembransegmenten (s. Abb. 9). Hierbei wird das 1. Bündel aus den TMS II-VI und das 2. Bündel aus den TMS VII-XI gebildet. Anhand der bisherigen Erkenntnisse wird angenommen, dass die TMS II und VII den Substrattransportraum für das Anion und das erste Natrium bilden und die TMS IX die Koordination des zweiten Natriums übernimmt. Die ungeformten Regionen zwischen den helikalen Transmembransegmenten sind anhand Untersuchungen weiterer ähnlicher Transporter (Portulano, et al., 2014; Ressler, et al., 2009; Faham, et al., 2008) notwendig, um die Flexibilität der TMS für Interaktion der Seiten- und Hauptkettenkontakte zu ermöglichen, ohne welche eine Substratkoordination nicht möglich ist (Portulano, et al., 2014).

Das Wissen über die Zusammenhänge der NIS Struktur mit seiner Funktion wurde bis dato hauptsächlich durch die Untersuchung von verschiedenen *NIS-Gen* Mutationen erlangt, die zu angeborenen Iod Transport Defekten (ITD) führen. Um festzustellen, ob dies auch bei den hier beschriebenen Mutationen der Fall ist, wurden diese weiter untersucht.

2.8. Patienten

Die in der Arbeit untersuchten Patienten wurden aufgrund einer angeborenen Hypothyreose in der Arbeitsgruppe molekulare pädiatrische Endokrinologie von Herrn Prof. Pohlenz in der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz genetisch untersucht, um mögliche Ursachen für die Hypothyreose zu finden. In der molekulargenetischen Untersuchung wurden bisher noch nicht beschriebene Mutationen im *NIS-Gen* identifiziert.

2.8.1. Patient 1

Die 1. Patientin (07/14) war zum Zeitpunkt der Vorstellung im Jahr 2014 neun Jahre alt und wurde aufgrund eines Verdachtes einer TSH-Resistenz vorgestellt. Beim

Screening auf eine Schilddrüsenhormonresistenz (RTH) und TSHR-Veränderungen wurden jedoch keine Mutationen nachgewiesen. Im erweiterten Screening zeigte sich eine Mutation im 6. Exon des *NIS*-Gens an dem Nukleotid Nr. 743 wobei ein Thyrosin durch ein Cytosin ersetzt wurde (c.743T>C). Dies führt in der Translation zum Einbau der Aminosäure Alanin anstelle von Valin an der Position 248 des Proteins (p.V248A) (s. Abb. 10).

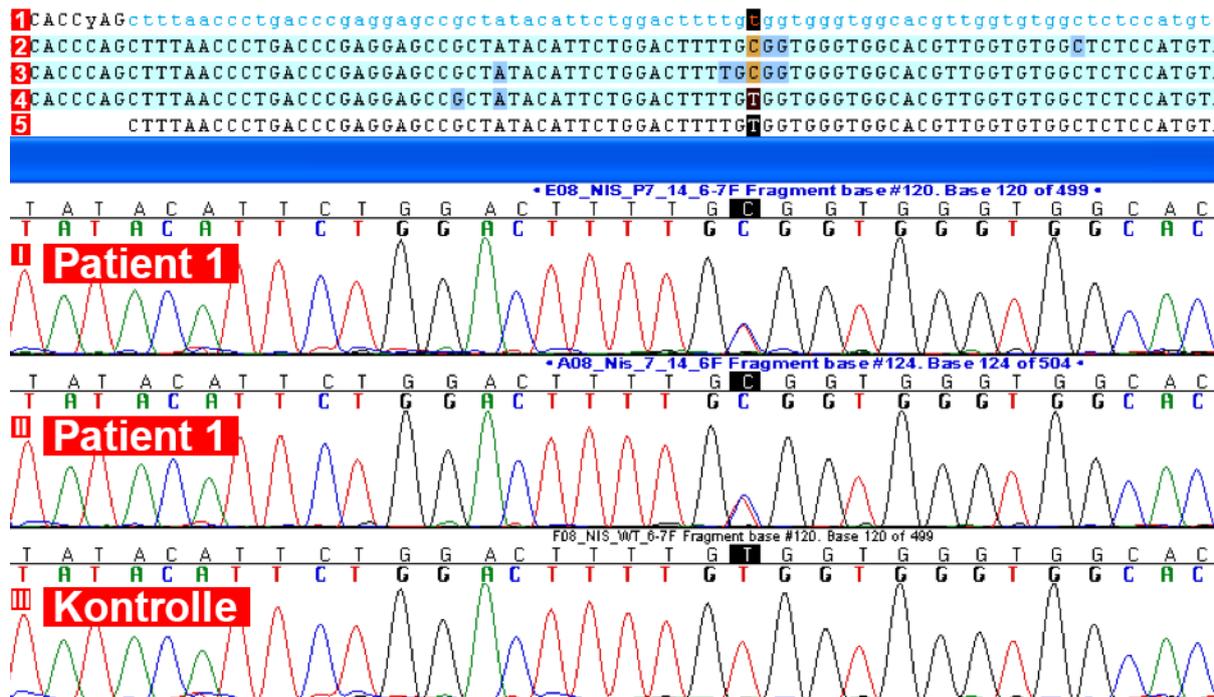


Abbildung 10 Sequencher Analyse des Exon 6 des *NIS*-Gens der Patientin 1 (07/14)

1 Sequenz NIS Exon 6-7;

2+3 Sequenzen der Pat. 1 (07/14) mit den dazugehörigen farbcodierten Diagrammen (I+II), der Ort der Mutation im 6. Exon ist schwarz und orange hinterlegt. Im Diagramm zeigt sich sowohl eine blaue Farbcodierung für Cytosin als auch eine Rote für Thymin, was auf eine heterozygote Mutation hinweist;

4 *Kontroll-Sequenz* des Wildtyps mit Thymin und dazugehörigem Diagramm III;

5 Bekannte Sequenz des Exon 6

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

Abgesehen davon zeigten *in silico* Analysen eine mögliche Veränderung der Bindungsstellen von Speißproteinen (s. Kap. 5.1.4) und somit eine mögliche Alteration des Spleißens (s. Abb. 11).

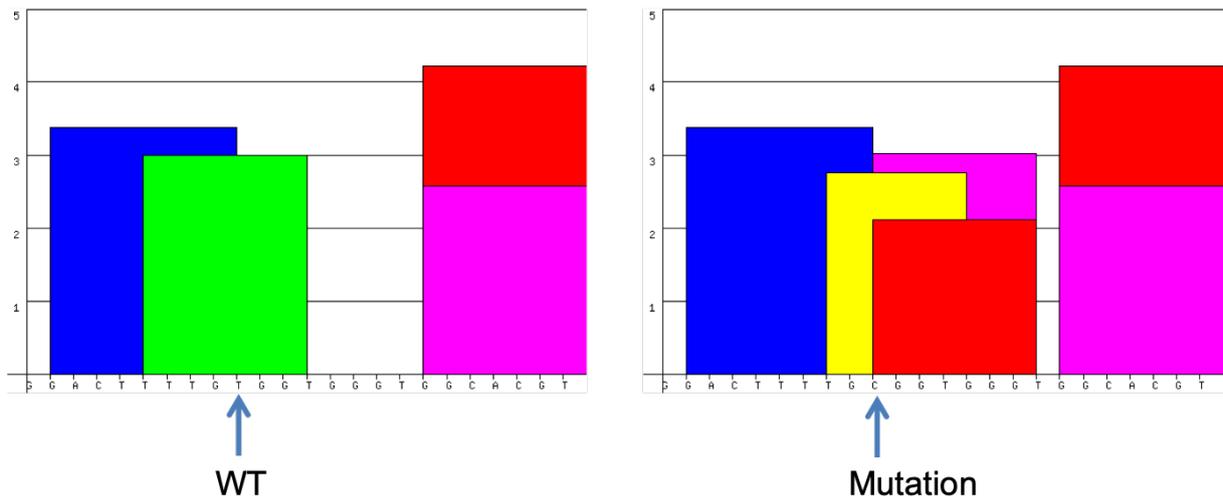


Abbildung 11 In silico-Analyse c.743T>C, p.V248A

Die verschiedenen farbigen Rechtecke markieren mögliche Bindungsstellen verschiedener Spleißproteine. Der Pfeil markiert die Stelle der Mutation, wobei die linke Graphik den Wildtyp (W) darstellt und die rechte Graphik die Mutation. Im Vergleich zeigt die Mutation eine Zunahme an möglichen Spleißproteinbindungen.

Weitere Analysen ergaben ebenfalls Hinweise auf mögliche Spleißveränderungen, da normalerweise Valin an dieser Stelle konserviert ist, weshalb diese Mutation näher untersucht wurde (s. Kap. 3.2., Kap. 4.4.1. und Kap. 5.4.1).

2.8.2. Patient 2

Die beiden anderen vorgestellten Patienten sind Schwestern kosanguiner Eltern und waren zu dem Zeitpunkt der genetischen Untersuchung zwei (P24/14) und elf (P25/14) Jahre alt. Sie wurden aufgrund des Verdachtes einer Schilddrüsenhormonbiosynthesestörung vorgestellt. Die molekulargenetische Untersuchung zeigte eine homozygote Mutation, c.1058+5G>C, im Intron 8 direkt fünf Basenpaare nach dem 8. Exon des *NIS*-Gens.

Die Untersuchung der Mutter (P49/15) und des Vaters (P50/15) zeigten eine heterozygote Mutation an derselben Lokalisation (c.1058+5G>C) (s. Abb. 12)

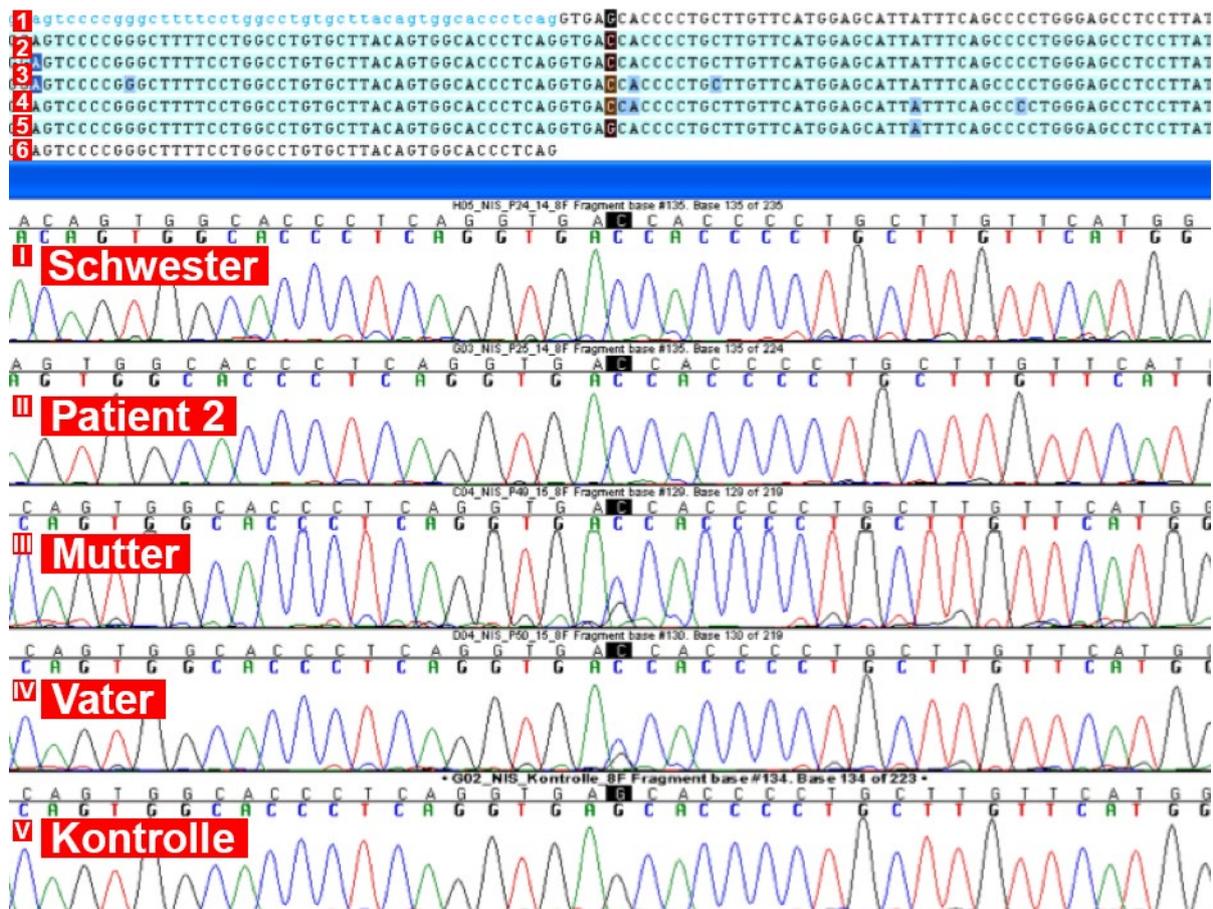


Abbildung 12 Sequencher Analyse des Exon 8 und Intron 8 des *NIS*-Gens der Patientin 2 (25/14), deren Schwester (24/14), sowie deren Mutter (49/15) und Vater (50/15)

1 Sequenz NIS Exon 8-9;

2 Sequenz der Schwester (24/14) mit dem dazugehörigen farbcodierten Diagramm (I), der Ort der Mutation nach dem 8. Exon ist schwarz hinterlegt. Im Diagramm zeigt sich eine blaue Farbcodierung für Cytosin;

3 Sequenz der Patientin 2 (25/14) mit dem dazugehörigen farbcodierten Diagramm (II); es zeigt sich die gleiche Mutation wie bei der Schwester (24/14)

4 Sequenz der Mutter (49/15) mit dem dazugehörigen farbcodierten Diagramm (III);

5 Sequenz des Vaters (50/15) mit dem dazugehörigen farbcodierten Diagramm (IV), in den Diagrammen des Vaters (IV) und der Mutter (III) zeigt sich sowohl eine blaue Farbcodierung für Cytosin als auch eine schwarze für Guanin, was auf eine heterozygote Mutation hinweist;

5 Kontroll-Sequenz des Wildtyps mit Guanin (G) und dazugehörigem Diagramm (V);

6 Bekannte Sequenz des Exon 8

Aufgrund der sich in der Konsensussequenz GURAGU im Spleißbereich nach dem Exon 8 befindlichen Lokalisation der Mutation ist eine Veränderung des Spleißens durchaus sehr wahrscheinlich. *In silico*-Analysen unterstützten diese Vermutung (s. Abb. 13), weshalb das Spleißverhalten der Mutationen in dieser Arbeit untersucht wurde (s. Kap. 3.2. und 4.4.2. und 5.4.2). Aufgrund der gleichen homozygoten Mutation der Schwestern wurde hier nur die DNA der älteren Patientin (25/14), Patientin 2 genannt, untersucht.

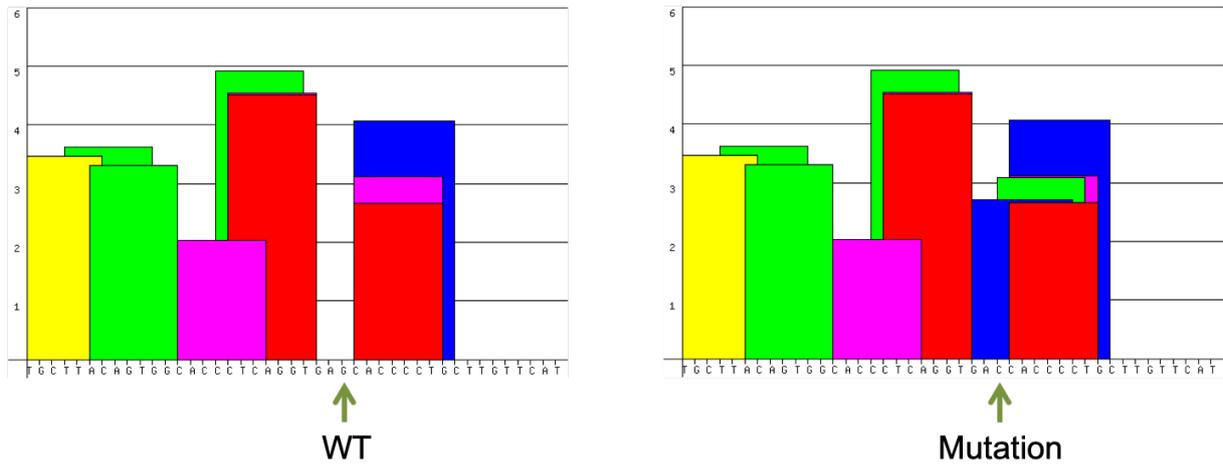


Abbildung 13 *In silico*-Analyse der Mutation c.1058+5G>C

Die verschiedenen farbigen Rechtecke markieren mögliche Bindungsstellen verschiedener Spleißproteine. Der Pfeil markiert die Stelle der Mutation, wobei die linke Graphik den Wildtyp (W) darstellt und die rechte Graphik die Mutation. Im Vergleich zeigt die Mutation eine Zunahme und Veränderung an möglichen Spleißproteinbindungen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Kits

QIAGEN® LongRange PCR Kit, QIAGEN, Hilden, Deutschland

Expand™ High Fidelity PCR System, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland

HiYield® Gel/PCR DNA Extraction Kit, Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting, Deutschland

mi-Plasmid Miniprep Kit, metabion international AG, Planegg, Deutschland

mi-Plasmid Midiprep Kit, metabion international AG, Planegg, Deutschland

mi-Gel Extraction Kit, metabion international AG, Planegg, Deutschland

QuikChange® XL-Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA

Reverse Transkription Kit, Promega Corporation, Mannheim, Deutschland

DNA Clean & Concentrator™-5, Zymo Research, Freiburg, Deutschland

SV Total RNA Isolation System, Promega Corporation, Mannheim, Deutschland

3.1.2. Geräte

NanoDrop 2000 von peqlab, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland

Gelelektrophorese:

- Power supply: Consort E831, peqlab, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland

Elektrophoresekammer:

- Model 40-1214, peqlab, VWR Life Science Competence Center, Erlangen, Deutschland
- Model B2, peqlab, VWR Life Science Competence Center, Erlangen, Deutschland

PCR-Gerät/Cycler:

- ARKTIK Thermal Cycler von Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
- Applied Biosystems 9700, Applied Biosystems, Weiterstadt (jetzt Thermofischer)
- Eppendorf Gradient

Schüttler:

- Mixing Block MB-102 der Firma BLOER,

Zentrifugen:

- Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- PicoFugeTM, Stratagene, Galaxy Mini, VWR International , Darmstadt
- Rotanta 460 R, Hettich Zentrifugen, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

Vortex:

- Charley 2, SLG, Gauting, Deutschland

Wasserbad:

- Julabo 19, Julabo, Seelbach, Deutschland

Absaugegerät:

- Mini-Vac power, peqlab, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland

Mikroskop:

- ID03, Zeiss, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

Sequenzier:

- Genetic Analyzer 3130 Applied Biosystems Weiterstadt, jetzt Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland

3.1.3. Primersequenzen

| | |
|---------------------|-----------------------------------|
| Primer NIS_5F_Bam: | CCCATGGGATCCGGCGGCATGAAGGCTGTGGTC |
| Primer NIS_7R_Xho: | GGTGGGGGATCCCTGGTCTGGGGCAGAGATGCG |
| Primer NIS_7F_Xho: | CTCTTCCTCGAGGGCCCTGCTCATCAACCAGGT |
| Primer NIS_10R_Xho: | GTGGGGCTCGAGCTGAAGGACACCTCCTCCGAG |
| Primer T7A | AATACGACTCACTATAGGG |
| Primer Sp6 | ATTTAGGTGACACTATAG |
| Primer 6/7F | GAAGTCAGCGTGACATCTCCACG |
| Primer 6/7R | GACCTCAATCCCACCAAGCTAGT |
| Primer 8F | GGACGTGCAGCATCAGGACAGAT |
| Primer TNIE4 | AGGTGCTGCCGCCGGGCGGTGGCTG |
| Primer RSV5U | CATTCACCACATTGGTGTGC |

Primer RSV5U2F CATACCCCGCTATGGGGCTGATC
 Primer RSV5U2R GACCGGCATAGGACAGAGATGG

3.1.4. Enzyme

RNAse A, QIAGEN, Hilden, Deutschland, EC 3.1.4.22.

T4 DNA Ligase (5U/ µl), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, EC 6.5.1.1.

BamHI, New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland, EC 3.1.21.4.

XhoI (40U/ µl), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, EC 3.1.21.4.

Taq-Polymerase I, Axon Laboratories, Reichenbach, Deutschland, EC 2.7.7.7.

Shrimp Alkaline Phosphatase, New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland, EC 3.1.3.1.

DNase I enzyme, Promega Corporation, Mannheim, Deutschland, EC 3.1.21.1.

AMV Reverse Transkriptase, Promega Corporation, Mannheim, Deutschland, EC 2.7.7.49.

3.1.5. Spleißvektoren

RHCglo-Splicing-Reporterplasmid

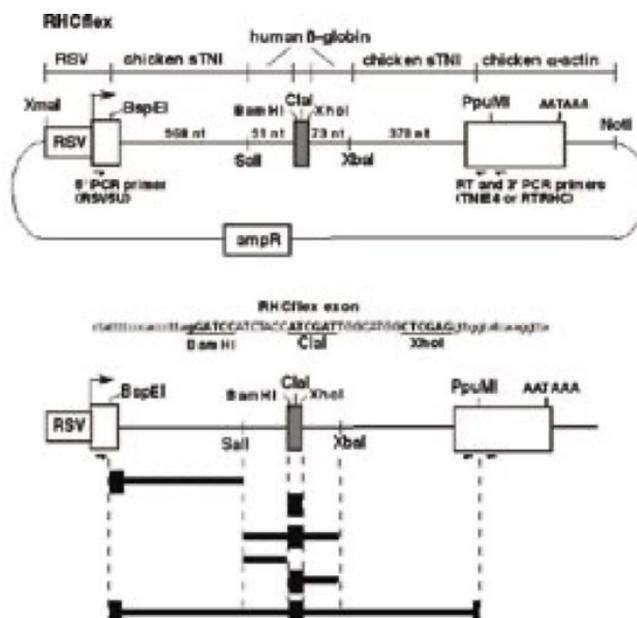


Abbildung 14 RHCglo-Splicing-Reporterplasmid

(A) RHCglo, mit allen Restriktionsstellen, die für das Plasmid einzigartig sind. Das mittlere Exon wird unmittelbar stromaufwärts und stromabwärts von den letzten bzw. ersten 91 und 73 Nukleotiden (nt) des menschlichen β-Globin-Introns 1 flankiert. Das distale Upstream-Segment von Intron 1 enthält die Introns 1 und 3 von Hühnerskelett-Troponin I (sTNI), und die distale Downstream-Region von Intron 2 enthält die letzten 364 nt von sTNI-Intron 3. RSV, Rous-Sarcoma-Virus-Enhancer/Promotor; RT, reverse Transkription; ampR, Ampicillinresistenzgen. (B) Einzigartige Restriktionsstellen innerhalb des

Minigens können verwendet werden, um eine Vielzahl von Gensegmenten zu ersetzen, einschließlich Segmente innerhalb des künstlichen Exons. Die Exon-Sequenz ist in Großbuchstaben und die Intron-Sequenz in Kleinbuchstaben angegeben (Singh & Cooper, 2006)

pGem, Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA

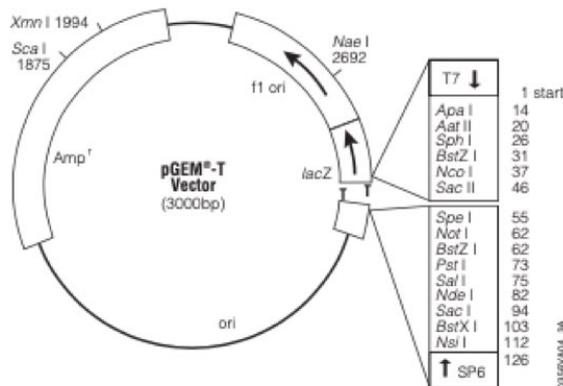


Figure 2. pGEM[®]-T Vector circle map and sequence reference points.

pGEM[®]-T Vector sequence reference points:

| | |
|--------------------------------------------------|--------------------|
| T7 RNA polymerase transcription initiation site | 1 |
| multiple cloning region | 10-113 |
| SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3) | 124-143 |
| SP6 RNA polymerase transcription initiation site | 126 |
| pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site | 161-177 |
| <i>lacZ</i> start codon | 165 |
| <i>lac</i> operator | 185-201 |
| β -lactamase coding region | 1322-2182 |
| phage f1 region | 2365-2820 |
| <i>lac</i> operon sequences | 2821-2981, 151-380 |
| pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site | 2941-2957 |
| T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3) | 2984-3 |

Abbildung 15 pGem[®]-T Vektor und Sequenz Referenzpunkte von Promega

pGem Vektor mit den Angaben der Position (Nukleotidnummern) der verschiedenen eingefügten Sequenzen. Amp^r = Ampicillinresistenzgen. (Promega, 2005)

3.1.6. Bakterien

NEB 5-alpha Competen E. coli (High Eddiciency) DH5aTM: fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 φ80Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR1, New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland

XL10-Gold® Ultracompetent cells: TetrΔ (mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr], Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA

3.1.7. Zellen

HeLa229 Zellen, ATCC, Manassas, Virginia, USA

3.1.8. Plastikverbrauchsmaterialien

10 cm Petrischalen, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Serologische Pipetten, Greiner, Frickenhausen, Deutschland
10 µl Pipettenspitzen, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
200 µl Pipettenspitzen, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
1000 µl Pipettenspitzen, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
1,5 ml Reaktionsgefäße, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
2,0 ml Safe-Lock Reaktionsgefäße, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
0,2 ml PCR Gefäße, MßP, Molecular Bio Products, San Diego, Kalifornien, USA

3.1.9. Weitere Materialien

Agarose, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Borsäure, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DPBS, gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Langenselbold, Deutschland
EDTA, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glasperlen, Ø2,85-3,45 mm, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
IPTG Solution, 100mM, Thermo Fisher Scientific Inc., Langenselbold, Deutschland
LB-Medium (Luria/Miller), Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
LB-Agar (Luria/Miller), Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Midori Green Advance, Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Optipan-Medium, Pan Biotech GmbH, PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Orange G, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Panzerin komplett Medium, PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Q-Solution, Quiagen, Hilden, Deutschland
SOC Nährmedium, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA, PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
TRIS Base, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
X-Gal 20%, MCLab, Nijmegen, Niederlande

3.2. Methoden

3.2.1. Isolation genomischer DNA aus EDTA-Blut

In ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 900 µl RBC Lysis Solution wurden 300 µl Patientenblut hinzugeben und 10 x invertiert. Nach 1 min Inkubation bei Raumtemperatur (bis das Lysat klar wurde), wurde 20s bei 10000g zentrifugiert, um die Leukozyten von den Erythrozyten zu trennen. Der Überstand mit den lysierten Erythrozyten wurde verworfen. Das erhaltene Pellet mit den Leukozyten wurde kurz mit einem Vortex gelöst und nach Zugabe von 300 µl Cell Lysis Solution erneut für 10 s mit einem Vortex gemischt, um die Zellen zu lysieren. Danach wurden 1,5 µl RNase A Lösung hinzugegeben, 25 x invertiert und 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert, um die in den Zellen enthaltene RNA zu verdauen. Anschließend wurden 100 µl Protein Precipitation Solution hinzugegeben, 20 s gemischt und 1 min bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 300 µl Isopropanol dekantiert und dieses 50 x invertiert. Dann wurde für 1 min bei 10000 g zentrifugiert, der Überstand dekantiert, 300 µl 70% Ethanol hinzugegeben und erneut für 1 min bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA Pellet 10 min bei 70°C getrocknet. Die DNA wurde in 70 µl DNA Hydration Solution gelöst. Das Reaktionsgefäß wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Konzentration und die Qualität wurde mit dem NanoDrop 2000 bestimmt. Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

3.2.2. Long Range PCR

Die genomische Sequenz von Exon 5 bis Exon 7 des *NIS*-Genes wurde mit dem Expand™ High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim) amplifiziert. Dazu wurden folgende Komponenten in einem PCR-Gefäß vermischt:

| Expand™ High Fidelity PCR System | |
|----------------------------------|---------------------|
| Komponente | Menge |
| H ₂ O | auf 50 µl auffüllen |
| Expand HF buffer 10x | 5 µl |
| PCR Nucleotide Mix | 1 µl |
| Q-Solution 5x | 10 µl |
| 10 µM Primer NIS 5F | 1,5 µl |

| | |
|----------------------------------|------------------|
| 10 µM Primer NIS 7R | 1,5 µl |
| Enzyme mix, high fidelity | 0,75 µl |
| DNA Template 450ng | entsprechende µl |

Tabelle 1 PCR-Ansatz nach Expand™ High Fidelity PCR System

Dazu wurden 450ng genomische DNA der Patientin 1 als Template in der PCR Reaktion verwendet. In einem 50 µl Ansatz wurden 5 µl 10 x Expand HF buffer, 1 µl PCR Nucleotide Mix, 10 µl 5 x Q-Solution, 1,5 µl des 10 µM Primers NIS 5F, 1,5 µl des 10 µM Primers NIS 7R, 0,75 µl high fidelity Enzyme mix, hinzu pipettiert und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Nachdem dem Vermischen und Anzentrifugieren wurden die PCR-Gefäße in einem Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert:

| PCR-Cycler 1 | |
|---------------------|-------------|
| Temperatur | Zeit |
| 96°C | 2 min |
| 96°C | 30 s |
| 56°C | 1 min |
| 68°C | 12 min |
| 68°C | 12 min |
| 16°C | ∞ |

} 39 Zyklen

Tabelle 2 Cyclerprogramm für Expand™ High Fidelity PCR System

Die DNA wurde am Anfang bei 96°C für 2 min denaturiert. Die folgenden 39 Zyklen bestanden aus je 30s Denaturierung bei 96°C, 1 min Annealing der Primer bei 56°C und 12 min für die Elongation bei 68°C. Nach Beendigung der 39 Zyklen wurde noch eine abschließende Elongation für 12 min bei 68°C durchgeführt und danach die Temperatur bis zur Entnahme auf 16°C gehalten. Das PCR Produkt wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. 5 µl des PCR-Produktes wurden dann auf ein 1% Agarosegel aufgetragen um die Qualität der PCR zu überprüfen (s. Kap. 4.1., Abb. 16).

Die genomische Sequenz von Exon 7 bis Exon 10 des *NIS*-Genes der Patientin 2 wurde mit dem QIAGEN® LongRange PCR Kit (QIAGEN) amplifiziert. Es wurden folgende Komponenten in einem PCR-Gefäß gemischt:

| QIAGEN® LongRange PCR Kit | |
|----------------------------------|---------------------|
| Komponente | Menge |
| H₂O | auf 50 µl auffüllen |
| LongRange PCR Buffer 10x | 5 µl |
| dNTP mix (je 10mM) | 2,5 µl |
| Q-Solution 5x | 10 µl |
| 10 µM Primer NIS 7F | 1,5 µl |
| 10 µM Primer NIS 10R | 1,5 µl |
| LongRange PCR Enzyme Mix | 0,4 µl |
| DNA Template 450ng | entsprechende µl |

Tabelle 3 PCR-Ansatz nach QIAGEN® LongRange PCR Kit

Dazu wurden 450ng genomische DNA der Patienten als Template in der PCR Reaktion verwendet. In einem 50 µl Ansatz wurden 5 µl 10 x LongRange PCR Buffer, 2,5 µl dNTP mix (je 10mM), 10 µl 5 x Q-Solution, 1,5 µl des 10 µM Primers NIS 7F, 1,5 µl des 10 µM Primers NIS 10R, 0,4 µl LongRange PCR Enzyme Mix hinzu pipettiert und mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt. Nachdem dem Vermischen und Anzentrifugieren wurden die PCR-Gefäße in einem Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert:

| PCR-Cycler 2 | |
|---------------------|-------------|
| Temperatur | Zeit |
| 93°C | 3 min |
| 93°C | 1 min |
| 58°C | 30 s |
| 68°C | 10 min |
| 68°C | 10 min |
| 16°C | ∞ |

} 39 Zyklen

Tabelle 4 Cyclerprogramm für QIAGEN® LongRange PCR Kit

Die DNA wurde am Anfang bei 93°C für 3 min denaturiert. Die folgenden 39 Zyklen bestanden aus je 1 min Denaturierung bei 93°C, 30s Annealing der Primer bei 58°C und 10 min für die Elongation bei 68°C. Nach Beendigung der 39 Zyklen wurde noch eine abschließende Elongation für 10 min bei 68°C durchgeführt und danach die Temperatur bis zur Entnahme auf 16°C gehalten. Das PCR Produkt wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. 5 µl des PCR-Produktes wurden dann auf ein 1% Agarosegel aufgetragen um die Qualität der PCR zu überprüfen (s. Kap. 4.1., Abb 16).

3.2.3. Gelelektrophorese

Zur Herstellung des 1% Agarosegels werden 99g 1 x TBE Puffer mit 1g Agarose vermischt, aufgekocht, nach einer kurzen Abkühlzeit 3 µl Midori Green Advance (Nippon) hinzugegeben und in die Gelkammer gegossen. Für das Formen der Taschen wurde ein Kamm verwendet und das Agarosegel polymerisierte für 20 min bei RT.

Der TBE Puffer wurde ebenfalls hergestellt, indem 10,8 g (89 mM) TRIS Base mit 5,5 g (89 mM) Borsäure und 0,92 g (2 mM) EDTA mit destilliertem Wasser auf 1000ml aufgefüllt wurde.

Sämtliche PCR Produkte und Plasmid DNA Produkte wurden zur Kontrolle der Ergebnisse mit horizontalen Agarosegels aufgetrennt. Als Gelelektrophoresepuffer wurde 1 x TBE Puffer verwendet. Das zu untersuchende Produkt wurde mit 5 µl Orange G vermischt, und auf einem 1%igen Agarosegel bei 130 V elektrophoretisch aufgetrennt.

Um die Größe des Produktes überprüfen zu können, wurde der 1kb DNA Marker verwendet. Die DNA Banden wurden mithilfe eines *Gel Imaging Systems* mit Anregung durch ein blaues LED Licht sichtbar gemacht. (s. Kap. 4.1., Abb. 16)

3.2.4. Aufreinigung der PCR Produkte

Die PCR Produkte (s. 3.2.2.) wurden mit Hilfe des HiYield® Gel/PCR DNA Extraction Kit der Firma Süd-Laborbedarf GmbH aufgereinigt, um nicht eingebaute Nukleotide und Primer zu entfernen. Dazu wurden zuerst 45 µl des PCR-Produktes in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 225 µl DF Buffer hinzugefügt und gut gemischt. Diese Lösung wurde in eine DF Column (Säule) pipettiert, die sich in einem 2 ml Collection Tube (Sammelgefäß) befand und für 30s bei 10000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 600 µl an Wash Buffer in die Mitte der Säule hinzugegeben. Nach 1-minütiger Inkubation bei RT wurde wieder für 30s bei 10000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation für 3 min bei 10000 g, um die Matrix der Säule zu trocknen und vom restlichen Ethanol zu befreien. Die Säule wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 30 µl Elution Buffer in deren Mitte

pipettiert. Nach einer 2-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde für 2 min bei 10000 g zentrifugiert. Die Konzentration der aufgereinigten DNA-Fragmente wurde mit einem NanoDrop 2000 gemessen und das Produkt bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.5. Restriktion

Für die Restriktion des DNA-Abschnittes von NIS 5-7 wurden 25 µl des aufgereinigten PCR Produktes (s. 3.2.4.) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und je 1µl der entsprechend benötigten Restriktionsenzyme BamH1 (20000 Units/ ml) und Xho1 (20000 Units/ ml) hinzugefügt. Dazu kamen noch 3 µl des 10 x Puffers 3. Zeitgleich wurde ein Ansatz mit derselben Menge an Enzymen und Puffer mit 1 µg des Vektors RHCglo hergestellt.

Für die Restriktion des DNA-Abschnittes von NIS 7-10 wurden 25 µl des aufgereinigten PCR Produktes (s. 3.2.4.) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und 1µl des entsprechend benötigten Restriktionsenzym Xho1 (20000 Units/ ml) hinzugefügt. Dazu kamen noch 3 µl des 10 x Puffers 3. Zeitgleich wurde ein Ansatz mit derselben Menge an Enzymen und Puffer mit 1 µg des Vektors RHCglo hergestellt.

Bei allen Ansätzen wurde das Reaktionsvolumen mit H₂O auf 30 µl aufgefüllt. Diese wurden dann über Nacht in ein Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Kontrolle des Erfolges der Restriktion wurde mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese (s. 3.2.3.) durchgeführt.

3.2.6. Aufreinigung der restringierten PCR Produkte

Die restringierten PCR Produkte (s. 3.2.5.) wurden mit Hilfe des HiYield® Gel/PCR DNA Extraction Kit der Firma Süd-Laborbedarf GmbH genau nach Herstellerangaben (s. 3.2.4. Aufreinigung der PCR Produkte) aufgereinigt und zur Ligation (s. 3.2.9.) weiterverwendet.

3.2.7. Dephosphorylierung

Zur Verringerung der Selbstligation des restringierten Vektors RHCglo (s. 3.2.5.) wurde dieser nach der Restriktion dephosphoryliert. Dazu wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, 23 µl des restringierten Vektors, 3 µl des 10 x Shrimp Alkaline Phosphat Buffer und 1,5 µl der *Shrimp Alkaline Phosphatase* (1000 Units/ml) gegeben, mit H₂O auf 30 µl aufgefüllt und vermischt. Dann wurde das Reaktionsgefäß für 40 min bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert, bevor das Enzym für 15 min bei 85°C deaktiviert wurde.

3.2.8. Gelaufreinigung

Der restringierte und dephosphorylierte RHCglo Vektor (s. 3.2.7.) wurde mit Hilfe eines 0,8% Agarosegels elektrophoretisch bei 130 V ca. 1 Stunde aufgetrennt, um die Vektor DNA von den verwendeten Reaktionsprodukten zu trennen. Die gewünschte Bande mit dem restringierten und desphosphorylierten RHCglo Vektor wurde aus dem Agarosegel herausgeschnitten und mit Hilfe des HiYield® Gel/PCR DNA Extraction Kits der Firma Süd-Laborbedarf GmbH aufgereinigt. Dazu wurde das ausgeschnittene Gelstück in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 500 µl DF Buffer gemischt. Danach wurde das Reaktionsgefäß für 12 min bei 59°C inkubiert und alle 3 min invertiert, damit das Gel sich komplett löste. Diese Lösung wurde in eine DF Column (Säule) pipettiert, die sich in ein 2 ml Collection Tube (Sammelgefäß) befand und für 30s bei 10000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, 400 µl W1 Buffer hinzugegeben und für 30s bei 10000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und 600 µl an Wash Buffer in die Mitte der Säule hinzugegeben. Nach 1-minütiger Inkubation bei RT wurde wieder für 30s bei 10000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation für 3 min bei 10000 g, um die Matrix der Säule zu trocknen und vom restlichen Ethanol zu befreien. Die Säule wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 30 µl Elution Buffer in deren Mitte gegeben. Nach einer 2-minütiger Inkubation bei RT wurde für 2 min bei 10000 g zentrifugiert. Die Kontrolle der Ausbeute nach Aufreinigung wurde mit Hilfe einer Gelelektrophorese (s. 3.2.3.) durchgeführt und das aufgereinigte Produkt bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.9. Ligation

Nach Aufreinigung des Restriktionsverdaus der zu untersuchenden DNA-Abschnitte (s. 3.2.6. und 3.2.8.) wurden nach Messung der Konzentration mit einem NanoDrop 2000 500ng des Produktes zur Ligation verwendet. Diese wurden mit 2 µl 10x Ligationspuffer, 2 µl 10x BSA, 500ng des restringierten RHCglo (nach Restriktionsverdau), 1 µl *T4 DNA Ligase* (400000 cohesive end units/ml), sowie mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt, vermischt und über Nacht bei 14°C inkubiert. Dazu wurde noch eine Kontrollligation (Negativkontrolle) des Vektors mit der gleichen Menge an RHCglo, 10x Ligationspuffer, 10x BSA, *T4 DNA Ligase* (400000 cohesive end units/ml) und 8 µl H₂O durchgeführt und ebenfalls über Nacht bei 14°C inkubiert.

3.2.10. Transformation

Nach der Ligation der Plasmide und der DNA-Inserts (s. 3.2.9.) wurden 10µl des Ligationsproduktes in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, mit 50 µl chemisch kompetenter Bakterien (XL10Gold, s. Material 3.1.) gemischt und anschließend 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 100 s in einem 42°C warmen Wasserbad. Danach wurden 400 µl eines SOC Nährmediums hinzugegeben und das Reaktionsgefäß für 1 h bei 37°C unter Agitation inkubiert, damit die Bakterien das Ampicillin Resistenzgen, das durch den Vektor aufgenommen wurde, exprimieren konnten. Davon wurden dann 150 µl mit Hilfe von Glasperlen mit einem Durchmesser von 2,85-3,45 mm der Firma Roth auf einer Agarplatte (s. 3.2.11.) verteilt und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.2.11. Agarplatten-Herstellung

Zur Herstellung der Agarplatten wurden 10g 1% Trypton mit 5g 0,5% Hefeextrakt, 10g 0,17 M NaCl, 10g Agar und 1l H₂O vermischt und autoklaviert. Die Lösung wurde auf 60°C abgekühlt, mit Ampicillin (10µg/ml) versetzt und die Mischung wurde dann unter der Sterilbank gleichmäßig auf Petrischalen (10 ml je Petrischale) verteilt und auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Die Petrischalen wurden abgedeckt, abgepackt und auf dem Kopf stehend bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

3.2.12. Herstellung LB-Medium mit Ampicillin

Für die Herstellung des LB-Mediums wurden 10g 1% Trypton mit 5g 0,5% Hefeextrakt, 10g 0,17 M NaCl und 1l H₂O vermischt und autoklaviert. Ampicillin Ratiopharm wurde mit Wasser zu einer Lösung von 100 mg/ml angesetzt und 500 µl zu 500 ml LB-Medium hinzugefügt. Das fertige Medium wurde dann bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

3.2.13. Überführung einzelner Kolonien in ein LB-Medium

Nach Kolonienwachstum auf den Agarplatten (s. 3.2.10.) wurden einzelne Kolonien in jeweils 3ml LB-Medium mit Ampicillin (c= 10µg/ml) (s. 3.2.12.) überführt. Diese wurden dann über Nacht unter Agitation und 37°C inkubiert.

3.2.14. Plasmid Miniprep

Für den Plasmid Miniprep wurde der mi-Plasmid Miniprep Kit von metabion verwendet. Die über Nacht inkubierten Bakterien im LB-Medium unter Ampicillin Resistenz Selektion (s. 3.2.13.) wurden für 15 min bei 6000 g pelletiert und der Überstand dekantiert. Danach wurde das Pellet mit 200 µl MX1 Buffer vollständig resuspendiert. Die Suspension wurde dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 250 µl MX2 Buffer hinzugefügt, das Gefäß 6 Mal invertiert und für maximal 5 min bei RT inkubiert bis das Lysat klar wurde. Nach Zugabe von 350 µl MX3 Buffer um das Lysat zu neutralisieren, wurde die Lösung vorsichtig vermischt und bei 10000 g für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette entnommen und in eine Säule (Mini Column + Collection Tube) überführt. Diese wurde nach Zentrifugation für 1 min bei 7000 g und Verwerfung des Durchflusses mit 500 µl WN Buffer gewaschen und erneut bei 7000g für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Danach wurden 700 µl WS Buffer hinzugefügt, bei 7000 g für 1 min zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und dann bei 10000 g für 3 min zentrifugiert, um die Säule zu trocknen. Die getrocknete Säule wurde dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 50 µl Elution Buffer auf die Membranmitte der Säule hinzugefügt, für 2-3 min bei RT inkubiert und dann bei 10000 g für 3 min zentrifugiert. Die Konzentration der eluierten Plasmid-DNA wurde mit einem NanoDrop 2000 gemessen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.15. Kontrollrestriktionsverdau der Plasmide

Zur Kontrolle welche der Plasmide erfolgreich mit den zu untersuchenden DNA-Abschnitten ligiert wurden, wurden jeweils 2 µl der eluierten Plasmid-DNA mit je 12 µl H₂O, 2 µl Puffer 3 10x, 2 µl BSA 10x, 1 µl Restriktionsenzym *Xho1* und bei NIS 5-7 noch 1 µl Restriktionsenzym *BamH1* zugefügt, invertiert und über Nacht im Wasserbad bei 37 C inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Restriktionsverdau dann mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert (s. Ergebnisse Kap. 4.2., Abb. 17) und diejenigen Plasmide zur Sequenzierung ausgewählt, die Banden auf Höhe der Vektorgröße und den Größen der entsprechenden NIS-DNA Segmenten anzeigten.

3.2.16. Sanger-Sequenzierung

Um zu überprüfen, dass keine weiteren Mutationen spontan durch die Klonierung aufgetreten sind, wurden die Plasmide, welche die zu untersuchenden DNA-Abschnitte enthielten (s. 3.2.15.), sequenziert (s. 3.2.17.). Für die Sequenzierung der Plasmide wurden in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß zu 500ng der isolierten Plasmid-DNA (s. 3.2.14.), jeweils 1 µl Primer 5 µM, 2 µl Big Dye Terminator v3.1 Sequenzierungs Mix und 1 µl 5 x Sequenzierungspuffer hinzugegeben, mit H₂O auf 12 µl aufgefüllt und gemischt. Der Ansatz wurde dann in den Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert:

| Sequenzierungs-Cycler | |
|-----------------------|-------|
| Temperatur | Zeit |
| 94°C | 2 min |
| 96°C | 10 s |
| 60°C | 4 min |
| 12°C | ∞ |

} 25 Zyklen

Tabelle 5 Cyclerprogramm für Sequenzierung

Das Template wurde bei 94°C für 2 min denaturiert. Die folgenden 25 Zyklen bestanden aus je 10s Denaturierung bei 96°C und 4 min für die Elongation bei 60°C. Danach wurde das Produkt bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.17. Fällung der Sequenzprodukte

Nach der Sequenzierung der ligierten Plasmid-DNA (s. 3.2.16.) wurde das Reaktionsprodukt in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 8 µl H₂O und 2 µl 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 55 µl 100% Ethanol gut vermischt. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 30 min bei 4°C und 12000 g. Danach wurde der Überstand dekantiert und das Reaktionsgefäß kurz kopfüber auf Papier gestellt, um den Überstand so vollständig wie möglich zu entfernen. Nun wurden 200 µl 70% Ethanol dazugegeben und erneut für 20 min bei RT und 12000 g zentrifugiert. Nach erneuter Dekantierung des Überstandes und kurzem Abtropfen auf Papier wurde das Pellet für 10 min bei 70°C getrocknet. Daraufhin wurden 15 µl deionisiertes Formamid hinzugegeben und dann das DNA-Pellet darin gelöst. Die Proben wurden mit einem Genetic Analyzer 3130 elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

3.2.18. Kultivierung von HeLa-Zellen

Die Vitalität der HeLa-Zellen wurde täglich mit Hilfe eines Mikroskops kontrolliert und bei Bedarf das Medium gewechselt oder die Zellen verdünnt. Dazu wurde das vorhandene Medium mit Hilfe einer Pasteur Glaspipette und einer Absaugpumpe entfernt, die Platte mit 10 ml 1xPBS gewaschen, da das im Medium enthaltene Serum den nächsten Schritt inhibieren würde. Nach Zugabe von 3 ml Trypsin-EDTA für 3 min, um die adhärenen Zellen von der Platte zu lösen wurde dieses wieder entfernt und die Platte erneut mit 10 ml 1 x DPBS gewaschen. Nach Absaugen des DPBS und der überschüssigen Zellen wurden 10 ml Panzerin komplett Medium hinzugegeben und die Platte bei 37°C, 5% CO₂ und Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.2.19. Transfektion

Die Transfektion wurde nach dem jetPRIME® short protocol von Polyplus transfection® durchgeführt. Acht Stunden vor der geplanten Transfektion wurde das Medium der Zellen (s. 3.2.18.) von der Platte mit Hilfe einer Pasteur Glaspipette und einer Absaugpumpe entfernt und die Zellen mit 10 ml 1xPBS gewaschen um das im Medium enthaltene Serum zu entfernen, da dieses den nächsten Schritt inhibieren würde. Dann erfolgte die Zugabe von 3 ml Trypsin-EDTA. Nach 3 min wurden 10 ml Panzerin komplett Medium hinzugegeben um das Trypsin zu inhibieren und die gelösten Zellen

samt Medium in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden für die Transfektion zu einer Konfluenz von 70% in 24-well Platten aufgeteilt und 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Sobald die Zellen adhärent waren, wurde das Medium entfernt und durch 300 µl 1 Optipan-Medium ersetzt. 500 ng der zu untersuchenden ligierten und nach Sequenzanalyse selektierten Plasmid-DNA wurden jeweils mit 50 µl jetPRIME® buffer verdünnt und 10 s gut gemischt. Nun wurde 1 µl des jetPRIME® Reagenzes hinzugegeben, erneut für 10 s gut gemischt und dann 10 min bei RT inkubiert. Nach den 10 Minuten Inkubationszeit wurde der Transfektions-Mix zu den Zellen auf der 24-well Platte hinzugefügt und die Platte erneut im Brutschrank inkubiert. 6 Stunden nach der Transfektion wurden 500 µl Panzerin komplett Medium in jedes Well hinzu pipettiert. Danach wurde die Platte 24 h im CO₂ Brutschrank inkubiert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen 3 Mal mit 10 ml 1 x PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 300 µl Lyse Puffer gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Zelllysate wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.20. RNA Extraktion

Zur RNA Extraktion aus den transfizierten Zellen (s. 3.2.19.) wurde das SV Total RNA Isolation System von Promega verwendet. Zu dem erhaltenen Zelllysate wurden 350 µl RNA Dilution Buffer hinzugegeben, das Reaktionsgefäß 4x invertiert, für 3 min bei 70°C inkubiert und dann 10 min bei 20°C und 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß pipettiert, 200 µl 96% Ethanol dazugegeben und gemischt, bevor das Gemisch auf die Spin Column Assembly (Säule und Sammelgefäß) überführt wurde, um für 1 min bei 10000 g zentrifugiert zu werden. Der Durchfluss wurde verworfen, 600 µl RNA Wash Solution auf die Säule gegeben und erneut für 1 min bei 10000 g zentrifugiert. Dann wurde der *DNase I* Incubation Mix vorbereitet, indem 40 µl Yellow Core Buffer, 5 µl 0,09M MnCl₂ und 5 µl *DNase I enzyme* in einem Reaktionsgemisch vorsichtig gemischt wurden. 50 µl dieses frisch zubereiteten *DNase I* Incubation Mix wurden dann in die Mitte der Säule gegeben und für 15 min bei RT inkubiert, um die DNA zu verdauen. Danach wurden 200 µl DNase Stop Solution in die Säule gegeben und für 1 min bei 10000 g zentrifugiert. Direkt danach wurden 600 µl RNA Wash Solution in die Säule gegeben und für 1 min bei 10000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und nach Zugabe von 250 µl

RNA Wash Solution für 2 min bei 10000 g zentrifugiert. Die Säule wurde danach in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 100 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben und für 1 min bei 10000 g zentrifugiert, um die RNA von der Säule zu lösen. Die Konzentration extrahierte gesamt RNA wurde mit einem NanoDrop 2000 gemessen und die extrahierte RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.21. Reverse Transkription

Als Vorbereitung zur Sequenzierung der erhaltenen RNA wurde nach der RNA Extraktion (s. 3.2.20.) eine Reverse Transkription der RNA mit dem Reverse Transkription Kit von Promega durchgeführt. Dazu wurde 2 µg der extrahierten RNA mit RNase-freiem H₂O in 10µl Gesamtvolumen verwendet. Dieses Gemisch wurde für 10 min bei 70°C denaturiert und dann für 1 min auf Eis inkubiert bevor folgende Komponenten hinzugegeben wurden:

| Reverse Transkription (Promega Kit) | |
|------------------------------------------------|--------------|
| Komponente | Menge |
| H₂O + RNA 2 µg (vorbereitet) | 10 µl |
| MgCl₂ | 4 µl |
| RT-Puffer 10x | 2 µl |
| dNTPs (je 10mM) | 2 µl |
| Random Primer | 0,5 µl |
| 10 µM Primer TNIE 4 | 0,5 µl |
| 10 µM Primer RSV5U F | 0,5 µl |
| RNase Inhibitor | 0,5 µl |
| AMV Reverse Transkriptase | 0,7 µl |

Tabelle 6 Reverse Transkription nach Promega Kit

Dieses Reaktionsgemisch wurde dann für 2 Stunden bei 42°C für die reverse Transkription inkubiert, danach für 5 min auf 95 °C erhitzt um die *Reverse Transkriptase* zu inaktivieren. Das Reaktionsprodukt wurde dann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.22. RT cDNA PCR

Nach der reversen Transkription wurden 2 µl der hergestellten cDNA (s. 3.2.21.) mittels einer PCR unter Verwendung von vektorspezifischen Primern amplifiziert. Hierzu wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

| cDNA PCR | |
|----------------------|---------------------|
| Komponente | Menge |
| H ₂ O | auf 50 µl auffüllen |
| PCR buffer 10x | 5 µl |
| MgCl ₂ | 1,5 µl |
| Betain | 2 µl |
| dNTP Mix | 2 µl |
| 10 µM Primer TINIE 4 | 1 µl |
| 10 µM Primer RSV5U | 1 µl |
| Taq Polymerase I | 0,25 µl |
| cDNA (3.2.21) | 2 µl |

Tabelle 7 PCR-Ansatz mit cDNA nach reverser Transkription

Das Reaktionsgemisch wurde dann mit folgendem Programm in einem Thermocycler inkubiert:

| cDNA PCR-Cycler | |
|-----------------|---------|
| Temperatur | Zeit |
| 93°C | 1 min |
| 93°C | 1 min |
| 54°C | 1 min |
| 72°C | 1,5 min |
| 72°C | 10 min |
| 16°C | ∞ |

40 Zyklen

Tabelle 8 Cyclerprogramm für cDNA PCR

Das PCR Produkt wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. 5 µl des PCR-Produktes wurden dann auf ein 1% Agarosegel mit 100 bp Marker aufgetragen um die Qualität und die Größe der PCR Produkte zu überprüfen.

3.2.23. Aufreinigung der cDNA nach PCR

Die cDNA PCR Produkte (s. 3.2.22.) wurden mit Hilfe des HiYield® Gel/PCR DNA Extraction Kit der Firma Süd-Laborbedarf GmbH genau nach Herstellerangaben (s. 3.2.4. Aufreinigung der PCR Produkte) aufgereinigt und die Konzentration mit einem NanoDrop 2000 gemessen. Ebenfalls erfolgte eine Kontrolle mittels Gelelektrophorese (s. Ergebnisse 4.3., Abb. 18).

3.2.24. Sequenzierung der cDNA

Für die Sequenzierung der aufgereinigten RT cDNA wurden in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß zu 500ng der isolierten RT cDNA (s. 3.2.22.), jeweils 1 µl Primer 5 µM, 2 µl Big Dye Terminator 3.1 Sequenzierungs Mix und 1 µl 5 x Sequenzierungspuffer hinzugegeben, mit H₂O auf 12 µl aufgefüllt und vermischt. Der Ansatz wurde dann in den Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert:

| RT cDNA Sequenzierungs Cycler | |
|-------------------------------|-------|
| Temperatur | Zeit |
| 94°C | 2 min |
| 96°C | 10 s |
| 60°C | 4 min |
| 12°C | ∞ |

} 25 Zyklen

Tabelle 9 Cyclerprogramm für Sequenzierung der RT cDNA

Das Template wurde bei 94°C für 2 min denaturiert. Die folgenden 25 Zyklen bestanden aus je 10s Denaturierung bei 96°C und 4 min für die Elongation bei 60°C. Danach wurde das Produkt bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.25. Fällung der Sequenzprodukte der cDNA

Die erhaltenen Sequenzprodukte der RT cDNA (s. 3.2.24.) wurden nach dem unter 3.2.17. Fällung der Sequenzprodukte stehendem Protokoll gefällt und danach mit einem Genetic Analyzer 3130 elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert (s. Ergebnisse 4.4.).

3.2.26. Subklonierung der cDNA mit Ligation in pGem-T Vektor

Aufgrund mehrfach festgestellter Überlagerung der untersuchten Sequenzen in der Sequenzanalyse erfolgte eine Subklonierung der RT-PCR cDNA (s. 3.2.22.), um eine Allel Trennung und separate Sequenzanalyse zu ermöglichen. Hierzu wurde zuerst die RT-PCR Produkte mit dem Vektor pGem von Promega nach folgendem Protokoll ligiert. 3 µl RT-PCR Produkt (s. 3.2.24.) wurden mit 1 µl des Vektors pGem, 5 µl 2x Ligation Buffer und 1 µl *T4 DNA Ligase* gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Das erhaltene Ligationsprodukt wurde in DH5α Bakterien transformiert (s. 3.2.10.) und einzelne Kolonien in ein LB-Medium inokuliert (3.2.13.). Es folgte ein Plasmid Miniprep (s. 3.2.14.) und eine erneute Sequenzierung (s. 3.2.16.) und Fällung der Sequenzprodukte (s. 3.2.17.) mit anschließender Analyse (s. Ergebnisse 4.4.).

4. Ergebnisse

4.1. Long Range PCR Gelelektrophorese

Zur weiteren Untersuchung der oben beschriebenen Mutationen wurden mit Hilfe genspezifischer Primer (s. Kap. 3.1.) die betroffenen Genabschnitte mit den angrenzenden Exons amplifiziert. Nach verschiedenen Anpassungen des PCR-Ansatzes und des PCR Programms, wurden die genomischen DNA Abschnitte *NIS* 5-7 für Patient 1 (c.743T>C, p.V248A) und *NIS* 7-10 für Patient 2 (c.1058+5G>C) nach den unter Kap 3.2.2 stehenden Protokollen amplifiziert. Die Größen der PCR Produkte wurden mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese kontrolliert (s. Abb. 16). Hierbei zeigten sich kräftige saubere Banden auf der Höhe von ca. 2000 und 4000 Basenpaaren, wobei die Negativkontrollen keine Banden zeigen. Da die hier untersuchten *NIS*-Genabschnitte Exon 5-7 2142 Basenpaare (Patient 1, s. Abb. 16. Nr. 2) und Exon 7-10 4256 Basenpaare (Patient 2, s. Abb. 16 Nr. 4) groß sind, bestätigen diese Banden eine erfolgreiche PCR (s. Abb. 16).

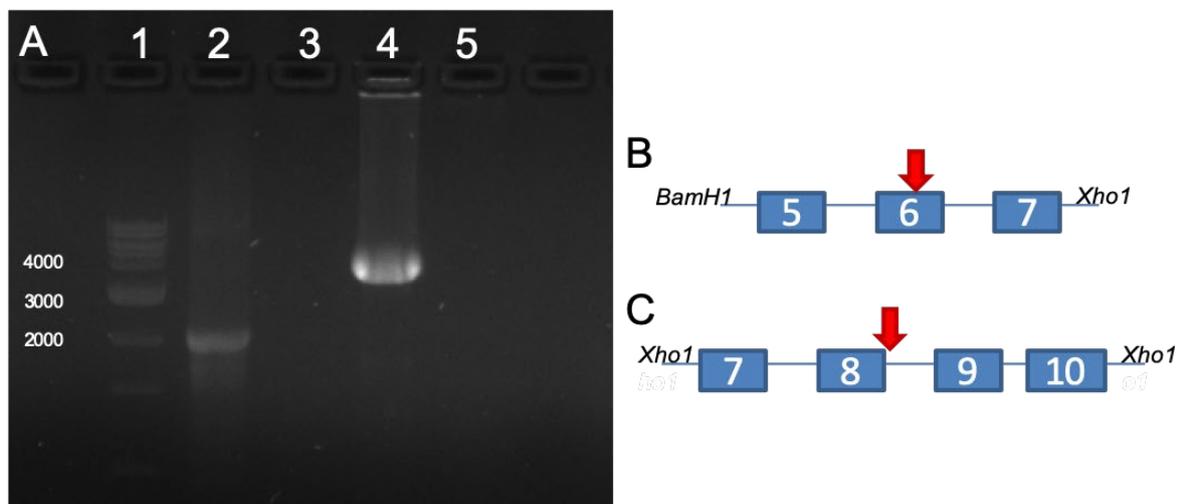


Abbildung 16 Long Range PCR Ergebnis und Schema der untersuchten Genabschnitte

A: 1 – Marker 1 kb Leiter
2 – PCR-Produkt *NIS* 5-7
3 – Negativkontrolle *NIS* 5-7

4 – PCR-Produkt *NIS* 7-10
5 – Negativkontrolle *NIS* 7-10
2000-4000 – Anzahl der Basenpaare

B: Schema des Genabschnittes Pat. 1 mit den Exons 5-7 unter Verwendung des Primers 5F mit einer Schnittstelle des Restriktionsenzym *Bam*H1 am 5'-Ende und des Primers 7R mit der Schnittstelle des Restriktionsenzym *Xho*1 am 3'-Ende, der Rote Pfeil markiert schematisch die Stelle der Mutation im Exon 6.

C: Schema des Genabschnittes Pat. 2 mit den Exons 7-10, unter Verwendung des Primers 7F mit einer Schnittstelle des Restriktionsenzym *Xho*1 am 5'-Ende und des Primers 10R mit der Schnittstelle des Restriktionsenzym *Xho*1 am 3'-Ende, der Rote Pfeil markiert schematisch die Stelle der Mutation, direkt nach dem Exon 8.

4.2. Plasmid-Prep-Gelelektrophorese

Nach dem Plasmidprep (s. Kap. 3.2.14.) wurde jeweils ein Kontrollrestriktionsverdau durchgeführt um die Plasmide zu bestimmen, die erfolgreich mit den zu untersuchenden DNA-Abschnitten ligiert wurden.

Nach wiederholten Versuchen konnten letztendlich Plasmide mit Banden in den erwarteten Größen, ca. 2000bp für *NIS* Exon 5-7 (s. Abb. 17, A+B), ca. 4000bp für *NIS* Exon 7-10 (s. Abb. 17, C) und ca. 6000bp für RHCglo (s. Abb. 17, A-C) identifiziert werden.

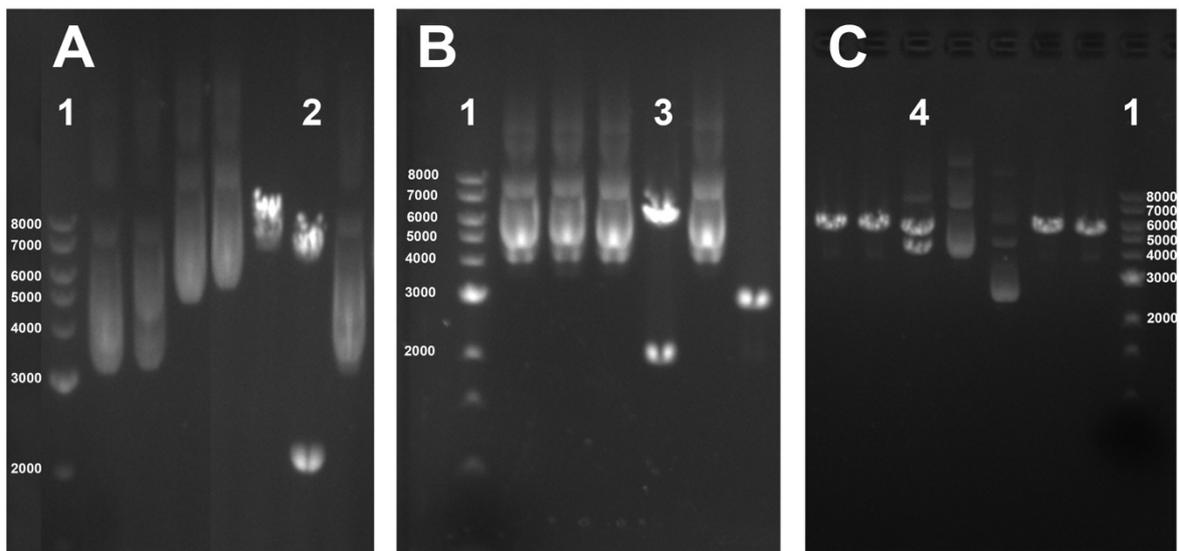


Abbildung 17 Plasmid-Gelelektrophorese

A: 1 – Marker 1 kb Leiter, 2 – *NIS* Exon 5-7 Wildtyp

B: 1 – Marker 1 kb Leiter, 3 – *NIS* Exon 5-7 Mutation

C: 1 – Marker 1 kb Leiter, 4 – *NIS* Exon 7-10 Mutation

A-C: 2000-8000 – Anzahl der Basenpaare,

Alle weiteren Banden sind Plasmide ohne erfolgreiche Ligation mit *NIS* oder mit nicht erfolgter Restriktion

Aufgrund des Vorhandenseins einer klaren Doppelbande in den entsprechenden Größen, konnte davon ausgegangen werden, dass diese Plasmide die gewünschten *NIS* Inserts beinhalteten und somit wurden die entsprechenden Plasmide zur Sequenzierung vorbereitet (s. Kap 3.2.16. und 3.2.17.).

4.3. cDNA PCR Kontrolle nach Reverser Transkription

Nach Transfektion der in 4.2. identifizierten Plasmide mit den gewünschten *NIS* Abschnitte und Extraktion der mRNA (s. Kap. 3.2.19-20) wurde eine Gelelektrophorese zur Kontrolle der Effektivität der Reversen Transkription und nachfolgender cDNA PCR (s. 3.2.21. und 3.2.22.) durchgeführt. Auch hier musste das Protokoll der cDNA-PCR mehrmals in Bezug der Primer, cDNA Menge und des Cycling-Protokolls angepasst werden bis das unter 3.2.22. beschriebene Protokoll zu den deutlichsten Banden führte.

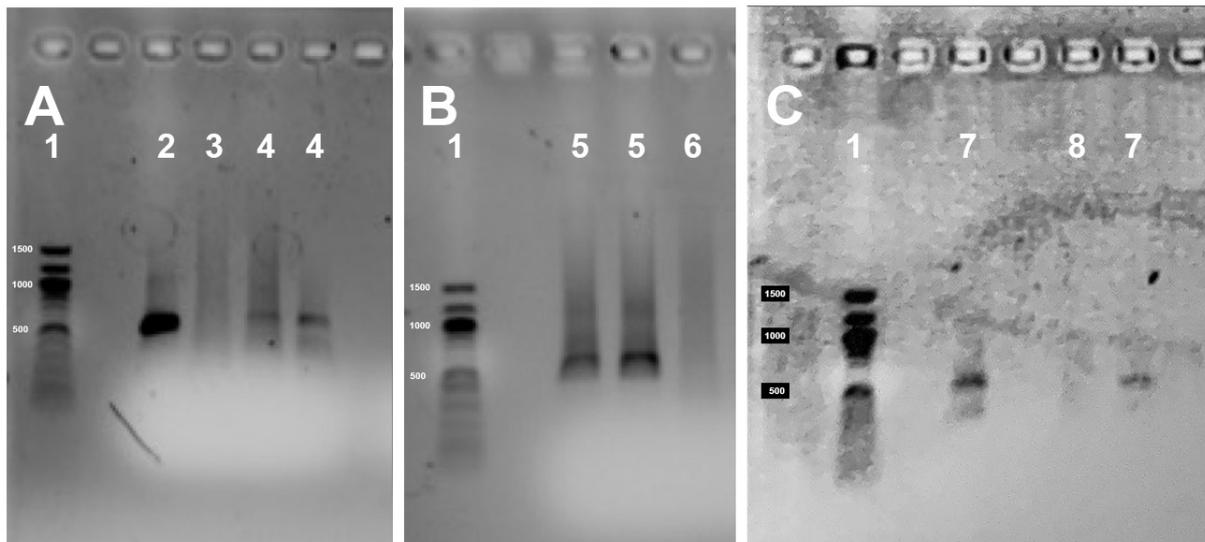


Abbildung 18 cDNA-PCR nach RT

A: 1 – Marker 100bp Leiter, 2 – *NIS* Exon 5-7 Mutation, 3 – Negativkontrolle, 4 – *NIS* Exon 5-7 Wildtyp

B: 1 – Marker 100bp Leiter, 5 – *NIS* Exon 7-10 Wildtyp, 6 – Negativkontrolle

C: 1 – Marker 100bp Leiter, 7 – *NIS* Exon 7-10 Mutation, 8 – Negativkontrolle

500-1000-1500 – Anzahl der Basenpaare

4.4. Sequenzierung der cDNA

Nach Amplifizierung der cDNA wurde diese nach den Sequenzierprotokollen in 3.2.24. und 3.2.25. vorbereitet, um mit dem Genetic Analyzer 3130 elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert zu werden.

Hierbei wurde besonderes darauf geachtet, ob die aus der gespleißten RNA erhaltene cDNA Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Mutationen zeigt und wenn ja welche.

4.4.1. NIS-Genabschnitt Exon 5-7

Im Genabschnitt des *NIS* 5-7 zeigte sich eine unveränderte Exon Reihenfolge der Exons 5, 6 und 7 mit darin enthaltener Mutation. Zum besseren Verständnis wurde dies schematisch dargestellt (s. Abb. 19). Die vollständige Sequenz des Spleißproduktes wird in Abb. 20 gezeigt.

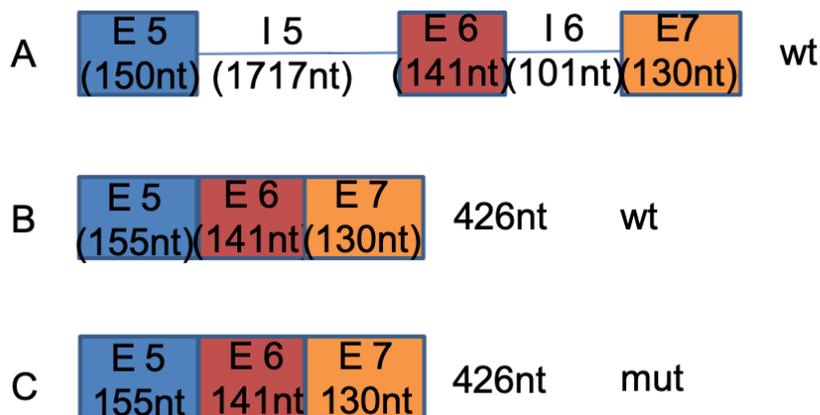


Abbildung 19 Schema prä-mRNA *NIS* Exon 5-7 und Spleißprodukte

A Prä-mRNA *NIS* Exon 5-7 Wildtypsequenz mit Exons (farbige Boxen) und Introns (Linien), die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der Nukleotide (nt) an.

B mRNA *NIS* Exon 5-7 Wildtyp (wt) mit 426 Nukleotiden

C mRNA *NIS* Exon 5-7 Mutation (mut) mit 426 Nukleotiden

In Abschnitt A der Abbildung 19 wird die Exon- (farbige Boxen) und Intron- (Linien) Abfolge des *NIS* Abschnittes Exon 5-7 gezeigt, die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der Nukleotide an. Die Exons 5, 6 und 7 zeigen sich sowohl im Spleißprodukt des Wildtyp (s. Abb. 19, B) als auch im Spleißprodukt der Mutation (s. Abb. 19, C) komplett vorhanden und aneinandergesetzt. Beide Produkte sind 426 Nukleotide lang, sodass davon ausgegangen werden kann, dass zumindest in dem untersuchten Abschnitt trotz der Mutation das Spleißverhalten nicht verändert wurde.

Sequenz des Spleißproduktes *NIS* 5-7 Mutation c.743T>C, p.V248A

GGC GGC ATG AAG GCT GTG GTC TGG ACT GAT GTG TTC CAG GTC GTG GTG
 ATG CTA AGT GGC TTC TGG GTT GTC CTG GCA CGC GGT GTC ATG CTT GTG GGC
 GGG CCC CGC CAG GTG CTC ACG CTG GCC CAG AAC CAC TCC CGG ATC AAC
 CTC ATG GAC TTT AAC CCT GAC CCG AGG AGC CGC TAT ACA TTC TGG ACT TTT
 GCG GTG GGT GGC ACG TTG GTG TGG CTC TCC ATG TAT GGC GTG AAC CAG

GCG CAG GTG CAG CGC TAC GTG GCT TGC CGC ACA GAG AAG CAG GCC AAG
 CTG GCC CTG CTC ATC AAC CAG/ GTC GGC CTG TTC CTG ATC GTG TCC AGC
 GCT GCC TGC TGT GGC ATC GTC ATG TTT GTG TTC TAC ACT GAC TGC GAC CCT
 CTC CTC CTG GGG CGC ATC TCT GCC CCA GAC CAG

Abbildung 20 Sequenz Spleißprodukt NIS 5-7 Mutation c.743T>C, p.V248A

Blau = Exon 5, Gelb = Exon 6 mit Mutation (Rot), Grün = Exon 7, A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin

4.4.2. NIS-Genabschnitt Exon 7-10

Die erhaltene cDNA des *NIS* Genabschnittes Exon 7-10 zeigte jedoch Überlagerungen in der Sequencher Analyse und konnte nicht eindeutig ausgelesen werden, weshalb eine Subklonierung der RT cDNA erfolgte (s. 3.2.26.)

Hierbei zeigten sich zwei verschiedene Ergebnisse mit verändertem Spleißen bei der Patienten-DNA. Zum besseren Verständnis wurden diese hier schematisch im Vergleich mit dem gespleißten Wildtyp dargestellt, die kompletten Sequenzen der gespleißten Patienten-cDNA werden in Abb. 22 und 23 gezeigt.

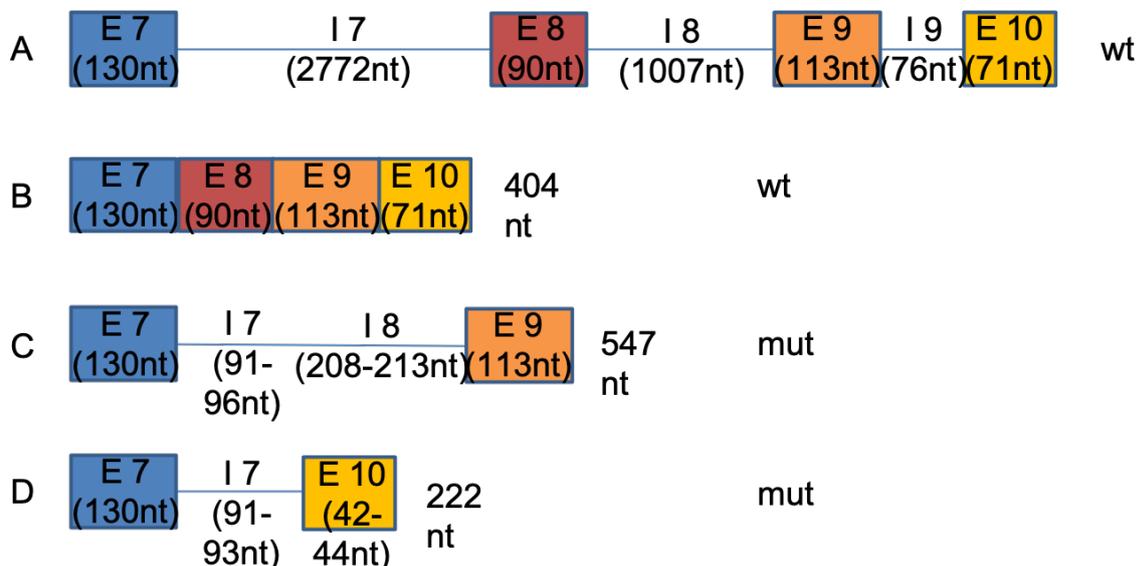


Abbildung 21 Schema prä-mRNA NIS Exon 7-10 und Spleißprodukte

A Prä-mRNA *NIS* Exon 7-10 Wildtypsequenz mit Exons (farbige Boxen) und Introns (Linien), die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der Nukleotide (nt) an.

B mRNA *NIS* Exon 7-10 Wildtyp (wt) mit 404 Nukleotiden

C mRNA *NIS* Exon 7-10 Mutation (mut) mit 547 Nukleotiden Ergebnis 1

D mRNA *NIS* Exon 7-10 Mutation (mut) mit 222 Nukleotiden Ergebnis 2

In Abschnitt A der Abbildung 21 wird die Exon- (farbige Boxen) und Intron- (Linien) Abfolge des *NIS* Abschnittes Exon 7-10 gezeigt, die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der Nukleotide an. In A ist die genomische Sequenz des WT *NIS* Genlokus gezeigt. Im Gegensatz zum Spleißprodukt des Wildtyps mit aufeinanderfolgenden Exons und insgesamt 404 Nukleotiden (s. Abb. 21, B), zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden erhaltenen Spleißprodukten der Mutation (s. Abb. 21, C und D). Das längere der Beiden (s. Abb. 21, C) zeigt ein Herausspleißen des 8. und des 10. Exons, wobei jedoch der Anfang des Introns 7 und das Ende des Introns 8 im Spleißprodukt verbleiben. Insgesamt besteht es aus 547 Nukleotiden. Die ungenaue Nukleotidangabe des Introns 7 und 8 resultiert aus insgesamt 5 Nukleotiden zwischen Intron 7 und 8, deren Sequenz in beiden Intronabschnitten identisch ist, sodass diese mit den hier verwendeten Methoden nicht eindeutig zugeordnet werden können (s. Abb. 22 - Rosa).

Das kürzere Spleißprodukt (s. Abb. 21, D) zeigt ein Herausspleißen des 8. und 9. Exons, sowie ein Fehlen des 5'Endes des 10. Exons. Ebenfalls erfolgt eine Intronretention, jedoch betrifft es hier alleinig das 3'Ende des 7. Introns. Auch hier zeigt sich eine Nukleotidüberschneidung der Sequenz des Intron 7 und des Exons 10, allerdings betrifft es hier nur 2 Nukleotide, welche nicht eindeutig zugeordnet werden können (s. Abb. 23 - Rosa).

Außerdem lässt sich bei beiden Spleißprodukten in der Intronsequenz ein TGA-Stoppocodon (s. Abb. 22 und 23, rot gekennzeichnet) identifizieren.

Sequenzen der Spleißprodukte *NIS* 7-10 Mutation c.1058+5G>C

```

G GCC CTG CTC ATC AAC CAG GTC GGC CTG TTC CTG ATC GTG TCC AGC GCT
GCC TGC TGT GGC ATC GTC ATG TTT GTG TTC TAC ACT GAC TGC GAC CCT CTC
CTC CTG GGG CGC ATC TCT GCC CCA GAC CAG GTG AGT CCC ACC CAG GCT
CCT GGT TGG CTC TGC ACT CCC TCA CTA GCT TGG GAT TGA GGT CGA AGA GCA
TTC CTA GCA GAG GGA ATG G CC TGT CTG TCC CAC CTG CCC TTG GTC ACA GGT
GTC CTT GCT CCT GTA GGG ATG TCT CAG GTC TTC GGG GAG GGG AGG GGC
AAA TAT CTC CTT CAC CTT TGC AGG ACT GGG TTA CCC CCA CCG TTG CCC TCA
GGC TGG GTG AGG TCT GGC AGG CCA GAT GGT GTG GAC GGT CTC TCC ATA
TGG CCT GAG GAC CCC CCG CTG CCT TCC TCA CAC AG C ACA GCA TCC ACC
AGC ATC AAT GCT ATG GCT GCA GTC ACT GTA/ GAA GAC CTC ATC AAA CCT
  
```

CGG CTG CGG AGC CTG GCA CCC AGG AAA CTC GTG ATT ATC TCC AAG GGG
CTC T

Abbildung 22 Sequenz längeres Spleißprodukt NIS 7-10 Mutation c.1058+5G>C

Grün = Exon 7, Hellgrau = Intron 7 mit TGA Stoppcodon (Rot), Rosa = unklar ob Sequenz von Intron 7 oder 8, Dunkelgrau = Intron 8, Gelb = Exon 9, A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin

G GCC CTG CTC ATC AAC CAG GTC GGC CTG TTC CTG ATC GTG TCC AGC GCT
GCC TGC TGT GGC ATC GTC ATG TTT GTG TTC TAC ACT GAC TGC GAC CCT CTC
CTC CTG GGG CGC ATC TCT GCC CCA GAC CAG GTG AGT CCC ACC CAG GCT
CCT GGT TGG CTC TGC ACT CCC TCA CTA GCT TGG GAT TGA GGT CGA AGA GCA
TTC CTA GCA GAG GGA ATG GCC GTG GCA GCC CTG TCC TCA CTG CTC GGA
GGA GGT GTC CTT CAG

Abbildung 23 Sequenz kürzeres Spleißprodukt NIS 7-10 Mutation c.1058+5G>C

Grün = Exon 7, Hellgrau = Intron 7 mit TGA Stoppcodon (Rot), Rosa = unklar ob Sequenz von Intron 7 oder Exon 10, Hellblau = Exon 10 letzte 42 Basenpaare, A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin

5. Diskussion

Die Ergebnisse der hier untersuchten Genabschnitte zeigten im Falle des Genabschnittes *NIS* 7-10 mit der Mutation c.1058+5G>C eine Störung des ursprünglichen Spleißverhaltens während der Genabschnitt *NIS* 5-7 mit der Mutation c.743T>C, p.V248A in den hier durchgeführten Untersuchungen kein verändertes Spleißen aufweist. Um diese unterschiedlichen Ergebnisse in Bezug zu dem Spleißverhalten im Wildtyp zu verstehen, ist es notwendig zuerst den Spleißvorgang näher zu beschreiben.

5.1. Spleißen

5.1.1. Übersicht über das prä-mRNA Spleißen

Wenn DNA im Zellkern transkribiert wird, entsteht eine precursor messenger RNA (prä-mRNA) mit Introns (nicht kodierende Regionen) und Exons (kodierende Regionen). Um eine reife Messenger RNA (mRNA) zu erhalten und damit Proteine in den Ribosomen translatieren zu können, müssen die Introns entfernt und die Exons zusammengefügt werden. Dieser Prozess findet kotranskriptionell und vor der Wanderung der prä-mRNA durch die Zellkernporen in Richtung Zytoplasma statt und wird Spleißen genannt. Erstmals wurde das Spleißen 1977 bei Untersuchungen humanpathogener Adenoviren entdeckt (Berget, et al., 1977; Chow, et al., 1977).

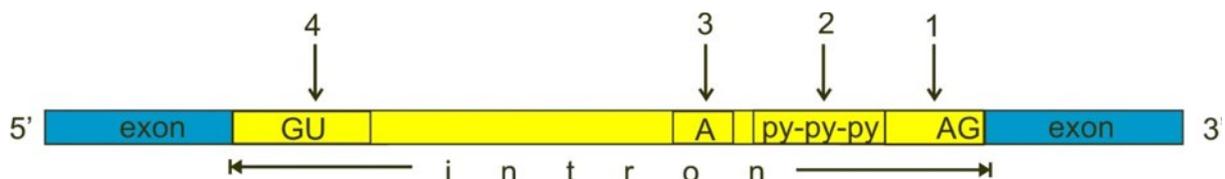


Abbildung 24 Intron mit Spleißstellen

- 1- Spleiß-Akzeptorstelle (3'SS) am 3'-Ende des Introns mit Adenin und Guanin (AG)
- 2- Polypyrimidintrakt (PY, bestehend aus Cytosin und Uracil)
- 3- Verzweigungsstelle mit Adenin (A)
- 4- Spleiß-Donorstelle (5'SS) am 5'-Ende des Introns mit Guanin und Uracil (GU)
(Ferg, 2011)

Damit das Intron herausgespleißt werden kann sind eine Spleiß-Donorstelle am 5'-Ende des Introns (s. Nr. 4 in der Abb. 24) und eine Spleiß-Akzeptorstelle am 3'-Ende des Introns (s. Nr. 1 in der Abb. 24), sowie ein Verzweigungspunkt (*branch point* (BP), s. Nr. 3 in der Abb. 24) nahe dem 3'-Ende des Introns erforderlich. Hierbei enthält die Spleiß-Donorstelle (5'SS) eine konservierte Sequenz mit GU (Basenfolge von Guanin

und Uracil) innerhalb einer größeren, weniger stark konservierten Region (s. Abb. 25). Ebenso besteht eine konservierte Region an der Spleiß-Akzeptorstelle (3'SS), allerdings mit einer AG-Sequenz (Adenin und Guanin). Stromaufwärts der Spleiß-Akzeptorstelle befindet sich ein Polypyrimidintrakt (PY, bestehend aus Cytosin und Uracil, s. Nr. 4 in der Abb. 24) und davor der Verzweigungspunkt mit einem Adeninnukleotid (Nr. 3 in Abb. 24), welches an der lassoartigen Schleifenbildung des Introns (englisch: *lariat*) (s. Abb. 25) beteiligt ist (Will & Luhrmann, 2011). Hierzu bindet zuerst der Verzweigungspunkt mit dem Adenin an die Spleiß-Donorstelle (5'SS), wobei die GU-Sequenz vom Exon abgespalten wird (s. Abb. 25, Schritt 1). Danach werden die beiden Exons über mehrere Schritte (s. Kap. 5.1.2.) miteinander verbunden (s. Abb. 25, Schritt 2), das Lariat abgespalten und es entsteht die gespleißte mRNA (s. Abb. 22) (Will & Luhrmann, 2011).

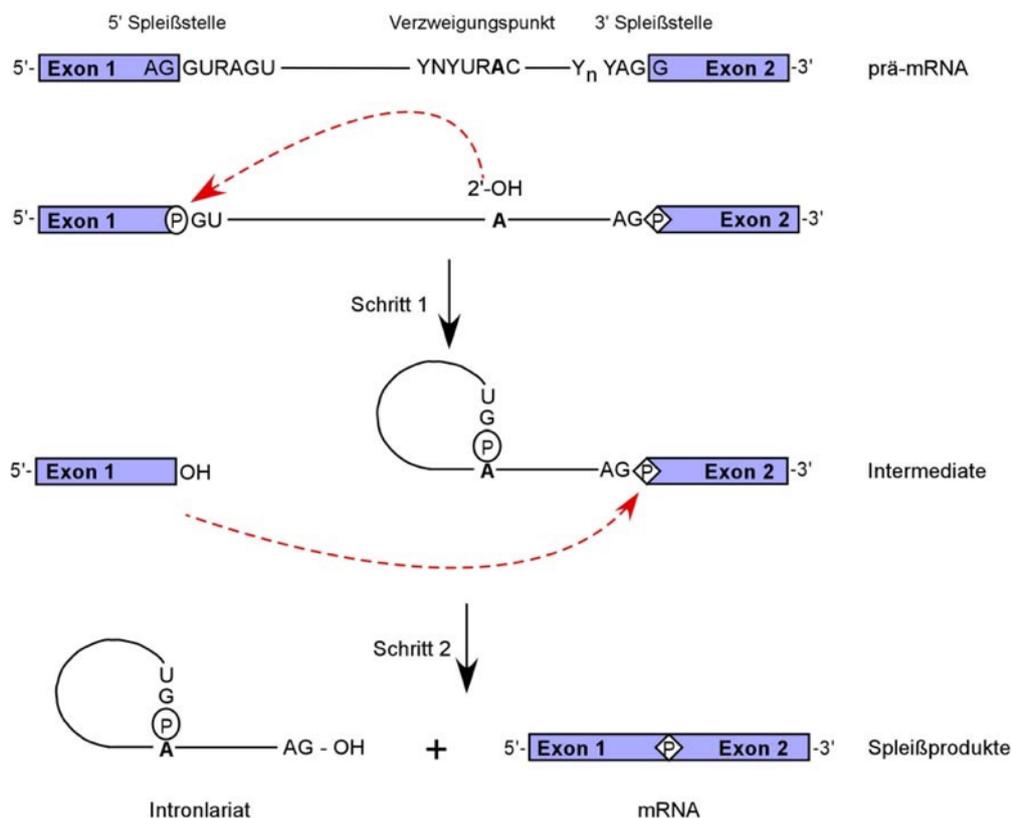


Abbildung 25 Die katalytischen Schritte der Spleißreaktion

Im ersten Schritt der Spleißreaktion erfolgt der nukleophile Angriff der 2'-OH-Gruppe des Verzweigungspunkt-Adenosins an die Phosphodiesterbindung der 5'-Spleißstelle. Dabei entstehen das freie Exon 1 und die Intronlariat/Exon 2 Struktur. Im zweiten Schritt erfolgt der nukleophile Angriff durch die 3'-OH-Gruppe des Exons 1 auf die Phosphodiesterbindung der 3'-Spleißstelle. Die Exons werden miteinander ligiert und das Intronlariat wird freigesetzt (Benecke, 2004)., Y= Pyrimidin (Cytosin (C) und Uracil (U)), R = Purin (Guanin (G) und Adenin (A)), N= jedes Nukleotid kann verwendet werden, P = Phosphat, Y_n = Polypyrimidintrakt

Die häufigste Konsensus-Sequenz für ein Intron (in IUPAC-Nukleinsäurenotation) ist: AG-[Schnitt]-**GURAGU** (Donorstelle) ... Intronsequenz ... **YURAC** (Zweigsequenz 20-50 Nukleotide stromaufwärts der Akzeptorstelle) ... Y-reicher Abschnitt- **NCAG**-[Schnitt]-G (Akzeptorstelle) (s. Abb. 22). Hierbei steht Y für die Pyrimidine Cytosin (C) und Uracil (U) und R für die Purine Guanin (G) und Adenin (A). N bedeutet, dass jedes der vier Nukleotide verwendet werden kann (Taggart, et al., 2012). Das Erkennen der Spleißstellen und die Katalysierung des Spleißens erfolgt in humanen Zellen durch Spleißosome.

5.1.2. Spleißosom

Ein Spleißosom ist ein Multi-RNA-Protein-Komplex und besteht aus mehreren kleinen nuklearen Ribonukleoproteinen (englisch: small nuclear ribonucleoproteins, snRNPs), die kleine, nicht kodierende RNA-Komponenten (snRNA) enthalten. Die RNA-Komponenten der snRNPs sind komplementär zu spezifischen intronischen Sequenzen. Dadurch erkennen und binden sie sowohl an die Verzweigungsstelle als auch die Spleißstellen der Exons und katalysieren das Herausspleißen des Introns. Außerdem sind sie an der Ligation der flankierenden Exons beteiligt. Bisher sind zwei verschiedene Spleißosomen bekannt, das Major- und das Minor-Spleißosom (Brow, 2002).

Das Major-Spleißosom, auch Hauptspleißosom genannt, spleißt an den oben beschriebenen typischen Spleißstellen mit GU an der 5'-Spleißstelle und AG an der 3'-Spleißstelle. Es setzt sich aus den snRNPs U1, U2, U4, U5 und U6 zusammen und ist im Zellkern aktiv. Darüber hinaus sind eine Reihe von weiteren Proteinen, darunter U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 (U2AF35), U2AF2 (U2AF65) und Spleißfaktor 1 (SF1), für den Aufbau des Spleißosoms erforderlich (s. Abb. 26). Das Spleißosom bildet während des Spleißvorgangs verschiedene Komplexe, zuerst Komplex E (s. Abb. 2), bei dem die Spleiß- und Verzweigungsstellen markiert und gebunden werden (Wahl, et al., 2009), dann die Komplex A, B1 und B2, bei denen weitere snRNPs binden, das Intron zur Lassostruktur gefaltet und die Exonspleißstellen einander angenähert werden (s. Abb. 26), bevor im Komplex C das 5'-Ende des Introns abgetrennt und mit dem Verzweigungspunkt (BP) verknüpft wird. Direkt danach wird auch das 3'-Ende des Introns vom Exon getrennt und das Lariat freigesetzt. Durch denselben Komplex werden auch die Exons mittels ATP-Hydrolyse miteinander ligiert

(s. Abb. 26, Zweiter Schritt) (Will & Luhrmann, 2011; Wahl, et al., 2009). Nach der Ligation der flankierenden Exons wird das freigesetzte Lariat abgebaut und die snRNPs recycelt. Diese Art des Spleißens macht mehr als 99% des Spleißens aus und wird als kanonisches Spleißen bezeichnet. (Wahl, et al., 2009)

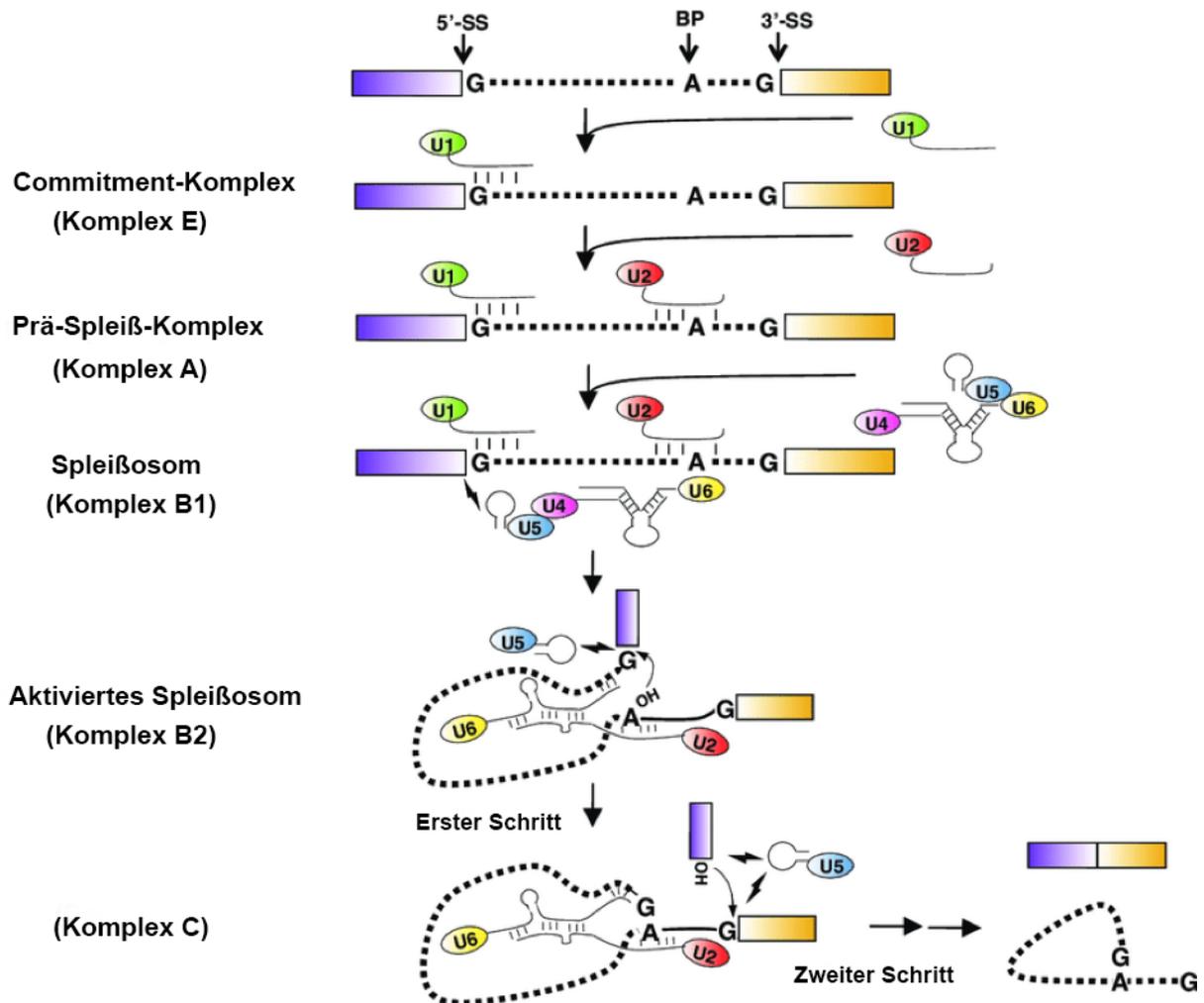


Abbildung 26 Major Spleißosom und Spleißvorgang

Die gepunkteten Linien stellen das Intron dar und die farbigen Kästchen sind Exons. Die 5'-Spleißstelle (5'-SS), die 3'-Spleißstelle (3'-SS) mit Guanin (G) und der Verzweigungspunkt (BP) mit Adenosin (A) sind in der Prä-mRNA angegeben. Die konservierten Reste an der Verzweigungsstelle und der 5'- und 3'-SS sind gezeigt. Die dünnen Linien sind snRNPs mit ihren Namen in den Ellipsen (U1-U6). Die 2 OH-Gruppen des Verzweigungspunkt-Adenosins und des abgetrennten 5'-Exons sind im aktivierten Spleißosom abgebildet. Die kleinen Pfeile in der Nähe der 2 OH-Gruppen zeigen die nukleophilen chemischen Reaktionen an. Das Spleißosom bildet beim Spleißen unterschiedliche Komplexe aus. Zuerst erfolgt die Ausbildung des Komplex E mit Bindung des snRNP U1 an die 5'-SS. Danach bindet U2 an den Verzweigungspunkt im Prä-Spleiß-Komplex A. Nach Bindung weiterer snRNPs (U4-6) wird das Spleißosom (Komplex B1) aktiviert (Komplex B2), das Intron zu einer Lassostruktur gefaltet und die Exonspleißstellen einander angenähert. Im Ersten Schritt greift die OH-Gruppe des Adenins des Verzweigungspunktes die 5'-SS an und trennt das Exon vom Intron. Im Komplex C greift die nun vorhandene OH-Gruppe an der 5'-SS die 3'-SS an, was im Zweiten Schritt zur Abspaltung des Introns an der 3'-SS und Ligation der beiden Exons führt. Das Intronlariat wird hierbei freigesetzt. Modifiziert nach (Zhao, et al., 2018).

Hat das Intron jedoch andere flankierende seltenere Sequenzen die nicht der GU-AG-Regel folgen, dann wird vom nicht-kanonischem Spleißen gesprochen, welches durch das Minor-Spleißosom katalysiert wird (Patel & Steitz, 2003).

Das Minor-Spleißosom ist dem Major-Spleißosom sehr ähnlich, verfügt jedoch über unterschiedliche, aber funktionell analoge snRNPs für U1, U2, U4 und U6, die jeweils als U11, U12, U4atac und U6atac bezeichnet werden. Das U5 snRNP ist jedoch bei beiden Spleißosomen dasselbe (Patel & Steitz, 2003). Ansonsten erfolgt die Komplexbildung wie beim Major-Spleißosom.

Je nach spezifischer Sequenz der Introns und der Anzahl der Nukleotide zwischen der Verzweigungsstelle und der nächsten 3'-Akzeptorstelle kann jedoch die Auswahl der Spleißstelle beeinflusst werden. Dies ist besonders wichtig um alternatives Spleißen zu ermöglichen.

5.1.3. Alternatives Spleißen

Werden alle Introns herausgespleißt und alle Exons aneinandergespleißt wird dies als konstitutives Spleißen bezeichnet. Soll die Zusammensetzung oder Abfolge der Exons in der reifen mRNA des gleichen Gens variiert werden, so geschieht dies durch alternatives Spleißen. Dadurch können auf Basis desselben Gens unterschiedliche Proteine hergestellt werden (s. Abb. 27). Es wird geschätzt, dass bis zu 95% der Transkripte von Genen mit verschiedenen Exons alternativ gespleißt werden, wobei einige Fälle gewebespezifisch und/oder unter bestimmten zellulären Bedingungen auftreten (Pan, et al., 2008).

Die häufigste Form des alternativen Spleißens in humanen Zellen ist das Überspringen eines oder mehrerer Exons, wie in Abb. 27 (A) sichtbar. Abgesehen des Überspringens eines Exons, gibt es auch noch sich gegenseitig ausschließende Exons (s. Abb. 27, D). Dies bedeutet, dass wenn eines dieser Exons verwendet wird, wird das Andere automatisch herausgespleißt (Di, et al., 2018).

Auch können unterschiedliche Donor- (s. Abb. 27, C) und Akzeptorstellen (s. Abb. 27, B) innerhalb eines Exons verwendet werden, wodurch das entsprechende Exon in der reifen mRNA verkürzt eingebaut wird (Di, et al., 2018).

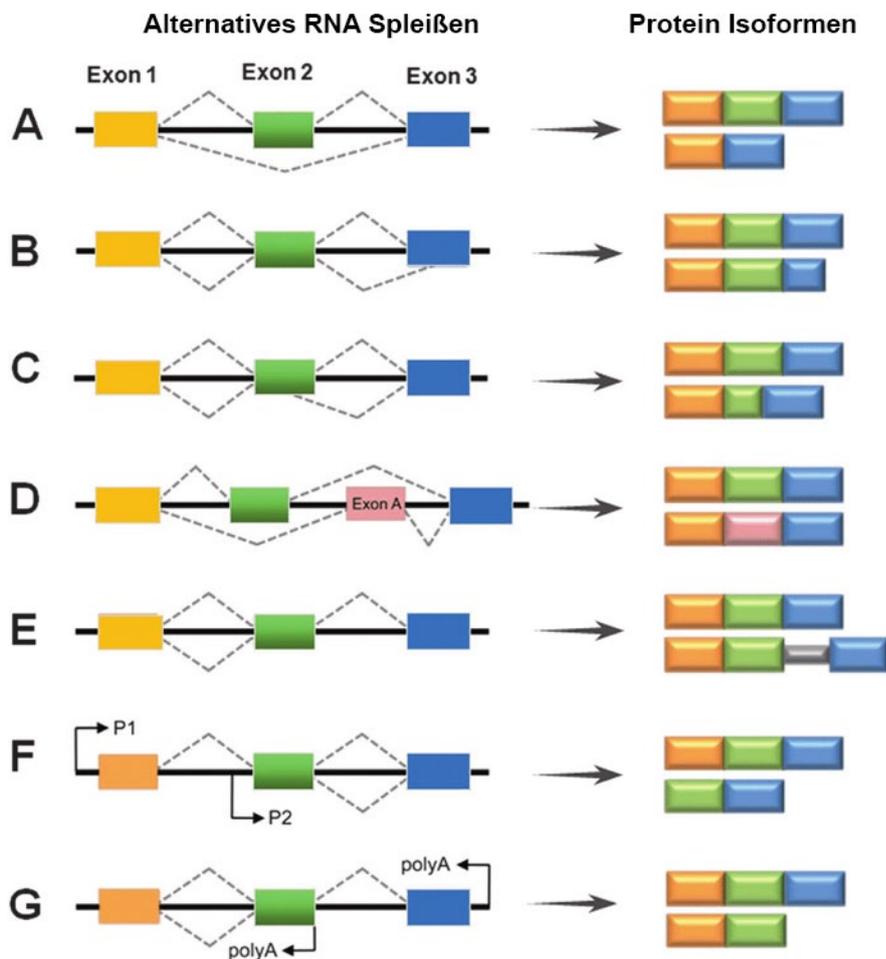


Abbildung 27 Schema alternativer Spleißformen der RNA

Die schwarz gestrichelten Linien zeigen das konstitutive Spleißen während die roten Linien die alternativen Spleißprozesse aufzeigen. Bei den Proteinisoformen wird jeweils in der oberen Reihe die konstitutiv gespleißte Proteinform gezeigt und unterhalb davon die entsprechende alternativ gespleißte Exonfolge (farbige Boxen) des Proteins. A *Exonskipping* = Überspringen eines Exons. B alternative 3' Spleißstelle, C alternative 5' Spleißstelle, D *mutual exclusive Exons* = einander ausschließende Exons (Exon A, rosa anstelle des grünen Exons), E Intron Retention (graue Box), F Verwendung unterschiedlicher Promoter (P), G alternative Polyadenylierung, polyA = Ort der Polyadenylierung. (modifiziert nach (Di, et al., 2018)).

Seltener verbleibt ein Teil eines Introns in der reifen mRNA. Dies wird als Intron Retention bezeichnet und führt oft zu einem Abbau der mRNA vor der Translation durch den *Nonsense-mediated decay* Mechanismus (NMD) welcher im Kap. 5.1.5. näher erläutert wird (Di, et al., 2018).

Weitere Möglichkeiten sind die Verwendung unterschiedlicher Promoter (s. Abb. 27, F), wodurch der Beginn des Proteins verschiebt oder eine Polyadenylierung an unterschiedlichen Stellen (s. Abb. 27, G), was zu einer unterschiedlichen Länge des Proteins führt (Di, et al., 2018).

Aufgrund der verschiedenen Möglichkeiten des alternativen Spleißens ist für die korrekte Auswahl der benötigten oder erwünschten Exons eine genaue Regelung des

Spleißprozesses notwendig. Dies geschieht unter anderem durch *Splice Enhancer* und *Splice Silencer*.

5.1.4. Spleiß Enhancer und Silencer

Spleiß Enhancer und Silencer sind kurze Sequenzen in Exons und Introns, welche die Erkennung und Verwendung von Spleißstellen beeinflussen indem sie verschiedene Proteine binden, die die benachbarten Spleißstellen entweder blockieren (*Silencer*) oder aktivieren (*Enhancer*). Zum Beispiel werden *Exonic Splice Enhancer* (ESE) (s. Abb. 28, roter Balken) aus speziellen Sequenzmustern gebildet, die sechs Nukleotidbasen umfassen und befinden sich wie der Name schon indiziert im Bereich des Exons. Diese spezielle Sequenz wird von SR-Proteinen (Englisch: *serine and arginine rich proteins*, s. Abb. 28, rote Kreise) erkannt, welche dann an die RNA binden und durch Interaktion mit anderen Proteinkomplexen die benachbarten Spleißstellen aktivieren (s. Abb. 28, graue Pfeile). SR-Proteine binden ebenfalls an die *Intronic Splice Enhancer* (ISE) (s. Abb. 28, roter Balken), welche sich in den Introns befinden. SR-Proteine sind Proteine mit vor allem zwei spezifischen Teilabschnitten, dem *RNA recognition motif* (RRM) mit welchem sie die spezielle RNA Sequenz erkennen und daran binden können und der SR-Domäne, welche aus Wiederholungen der Aminosäuren Serin (S) und Arginin (R) besteht. Außerdem haben sie viele weitere Funktionen u.a. bei der Transkription, der RNA Stabilisierung und der Translation sowie bei der Erkennung von nonsense-mediated decay codons (s. Kap. 5.1.5.) (Kornblihtt, 2013).

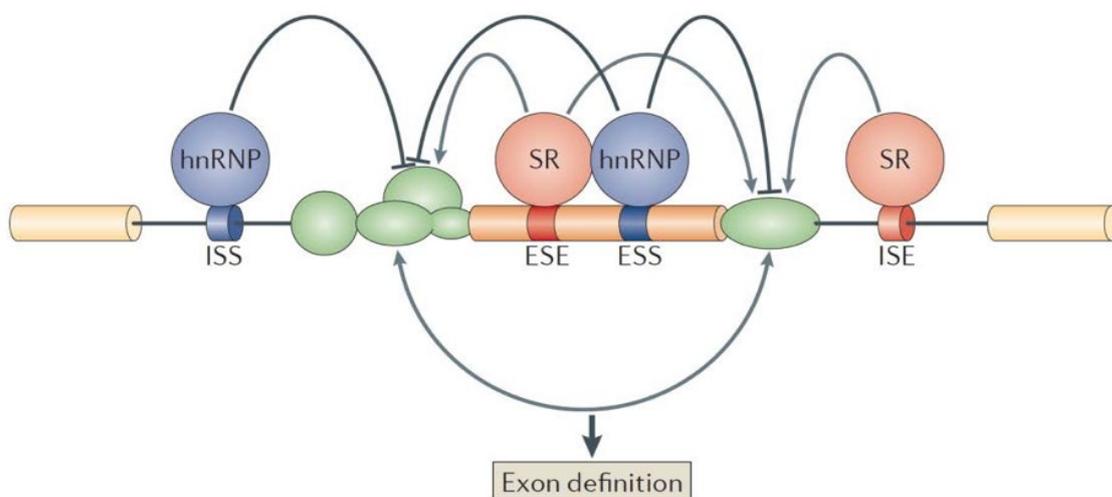


Abbildung 28 Einfluss der *Spleiß Enhancer* und *Silencer* auf das Spleißen

SR-Proteine (*serine and arginine rich proteins*, rote Kreise) binden sowohl an *Exonic Splice Enhancer* (ESE, Roter Teil des Exons), welche im Exon (Zylinder) lokalisiert sind, als auch an *Intronic Splice Enhancer* (ISE, roter Zylinder) des Introns (Schwarze Linie) und aktivieren (graue Pfeile) hierdurch die Spleißfaktoren des Spleißosoms (grün). Im Gegensatz dazu binden *heterogeneous ribonucleoprotein particles* (hnRNPs) an *Exonic Splice Silencer* (ESS) und *Intronic Splice Silencer* (ISS, blauer Zylinder) und inhibieren (Schwarze blockierende Pfeile) die Aktivität der Spleißfaktoren. (Kornblihtt, 2013)

Im Gegensatz dazu binden an *Exonic Splice Silencer* (ESS) im Exon und *Intronic Splice Silencer* (ISS) im Intron keine SR-Proteine, sondern *heterogeneous ribonucleoprotein particles* (hnRNPs) (s. Abb. 28, blaue Balken und Kreise). Diese sind Komplexe aus RNA und Protein, welche an die prä-mRNA u.A. an den Stellen der ESS und ISS binden und dafür sorgen, dass benachbarte Spleißstellen blockiert werden (s. Abb. 28, schwarze blockierende Pfeile). Dies kann dazu führen, dass das entsprechende Exon nicht in die mRNA eingebaut und übersprungen wird (Kornblihtt, 2013). Außerdem dienen hnRNPs auch als Signal, dass die prä-mRNA noch nicht vollständig prozessiert und gespleißt ist und somit den Zellkern noch nicht verlassen kann (Kinniburgh & Martin, 1976). Nach dem Herausspleißen verbleiben hnRNPs am Intron und sorgen für dessen Abbau.

Anhand von Konzentrationsunterschieden der SR-Proteine und der hnRNPs wird das Spleißen ebenfalls beeinflusst, da diese sich kompetitiv in ihrer Bindung hemmen (Sun, et al., 2017).

Eine Mutation in eine Enhancer- oder Silencer-Bindungsstelle kann somit zu einer Veränderung des Spleißens führen (Pohlenz, et al., 1998). Heutzutage gibt es verschiedene Programme, die eingegebene DNA-Sequenzen auf z.B. die bisher bekannten spezifischen Sequenzen verschiedener ESE scannen. Hierdurch kann eine mögliche Beeinflussung des Spleißens durch entdeckte Mutationen erkannt und näher untersucht werden.

Wie schon in der Einleitung und im Kap. 2.8. beschrieben, waren eben solche Analysen mit Hilfe eines ESE-Finders ein Grund zur Untersuchung des Spleißverhaltens der hier beschriebenen Mutationen.

Ebenfalls können Punktmutationen im Intron/Exon oder Transkriptionsfehler kryptische Spleißstellen an Stellen in Exons oder Introns aktivieren, an denen normalerweise nicht gespleißt wird, was zu fehlenden Exons oder nicht herausgespleißten Intronteilen in der reifen m-RNA führen kann (Pohlenz, et al., 1998). So sind etwa 60% aller Mutationen, die eine Krankheit hervorrufen, auf Spleißfehler

zurückzuführen (López-Bigas, et al., 2005). Dies wiederum kann zu einem nicht funktionalen oder trunkierten Protein führen. Oder die fehlerhafte mRNA wird durch ein zelleigenes Kontrollsystem erkannt und via *Nonsense-mediated decay* (s. Kap. 5.1.5.) abgebaut bevor sie translatiert werden kann.

5.1.5. Nonsense-mediated decay

Der Nonsense-vermittelte mRNA-Zerfall (*Nonsense-mediated decay*, NMD) ist ein zelleigenes Kontrollsystem um Fehler in der Genexpression zu reduzieren, indem mRNA-Transkripte, die vorzeitige Stoppcodons enthalten, eliminiert werden, da es durch die Verkürzung der Proteine, je nach Position des Stoppcodons zu Funktionseinschränkungen oder -ausfällen derselben kommen und somit die Zellfunktion eingeschränkt werden kann (Chang, et al., 2007). Entdeckt wurde NMD 1979. Es wurde festgestellt, dass Zellen mit Nonsense-Mutationen unerwartet niedrige Konzentrationen von mRNA der betroffenen Allele aufwiesen (Chang, et al., 2007; Pohlenz, et al., 1998)

Die Hauptkomponenten des NMD sind drei transagierende Proteine (up-frameshift protein, UFP 1-3). UFP 1 (s. Abb. 29, hellgrünes Rechteck) bildet nach Beendigung der Translation einen Komplex mit dem Ribosom und weiteren Proteinen, während UFP2 (s. Abb. 29, gelbes Rechteck) und UFP3 (s. Abb. 29, blaues Sechseck) einen Teil der Exon-Exon-Verbindungs-Komplexe (exon-exon junction complex, EJC, s. Abb. 29, hellblaues Symbol) sind, welche nach dem Spleißen an den Exon-Verbindungsstellen verbleiben. (Lewis, et al., 2003)

Der Prozess der Erkennung der vorzeitigen Stoppcodons findet während der Translation statt. Vermutet wird, dass das Ribosom (s. Abb. 29, hellbraun) beim ersten Translationsdurchgang die vorhandenen EJC entfernt (Abb. 29, Normales Transkript). Befindet sich ein vorzeitiges Stoppcodon in der mRNA, wird die Translation dort beendet und das Ribosom freigesetzt. Somit werden die sich stromabwärts befindenden EJCs nicht mehr entfernt und UFP1 kommt in Kontakt mit UFP2 und UFP3, welche an die nicht entfernten EJC gebunden sind, wodurch es zu einer Phosphorylierung des UFP1 kommt (s. Abb. 29, Transkript mit vorzeitigem Stoppcodon).

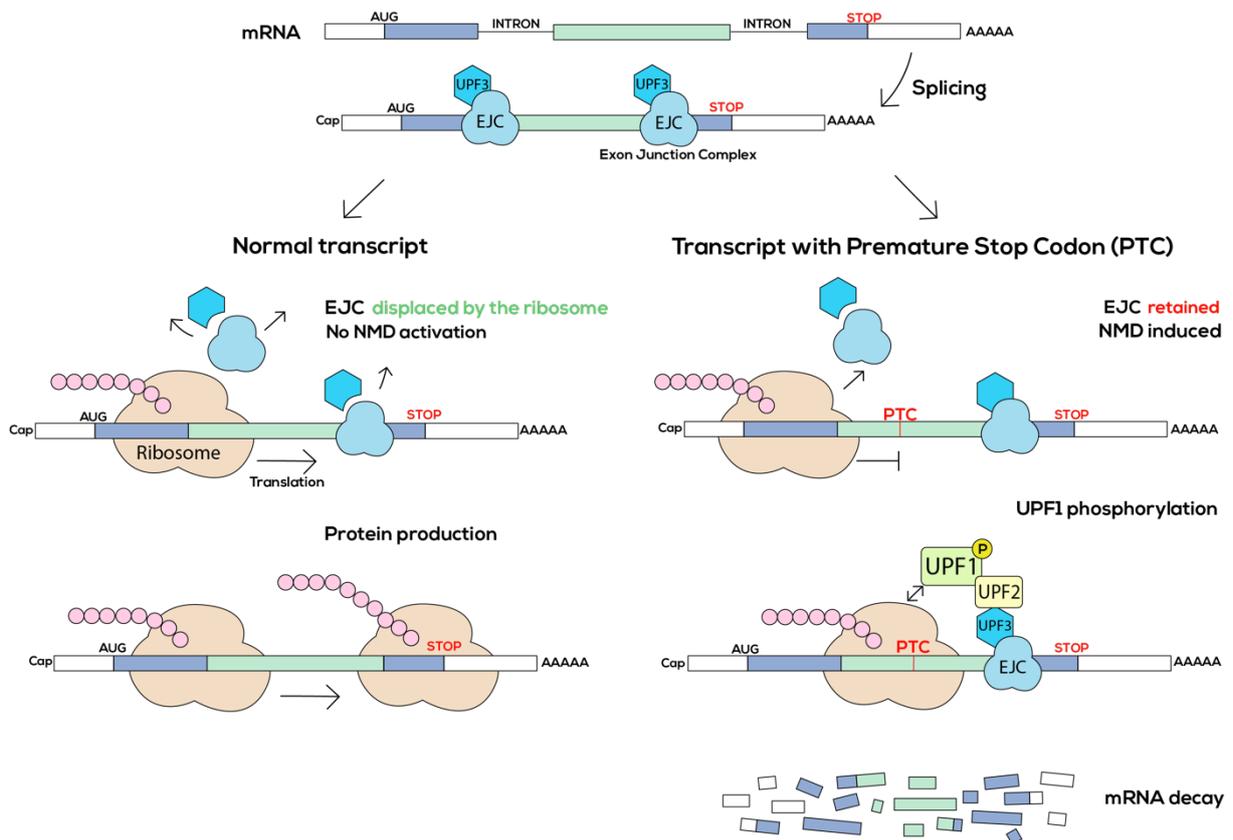


Abbildung 29 Nonsense-mediated decay

mRNA mit Exons (farbige Balken) und Introns (schwarze Linie). Nach dem Spleißen verbleiben Exon-Exon-Verbindungs-Komplexe (*exon-exon junction complex*, EJC, hellblau) an den Exon-Verbindungsstellen. UPF3 (*up-frameshift protein 3*, blaues Sechseck) ist an das EJC gebunden. Beim normalen Transkript werden die EJCs durch das Ribosom (hellbraun) entfernt und das Protein aus Aminosäuren (rosa Kugeln) gebildet. Zeigt sich nun ein vorzeitiges Stoppcodon (*Premature Stop Codon*, PTC), dann wird das Transkript beendet und die stromabwärts gelegenen EJCs werden nicht entfernt. Somit kommt das an das Ribosom bindende UPF1 mit UPF2 und UPF3 in Kontakt, das UPF1 wird phosphoryliert und der mRNA-Zerfall wird eingeleitet. Cap = 3' Capping, AAAAA = 5' Polyadenylation. Modifiziert nach (Walter, 2017)

Dies wiederum aktiviert den Prozess des NMDs, welcher zu einem Abbau der mRNA führt, wodurch keine weitere Translation des verkürzten Proteins erfolgt. Die Aktivierung des NMDs hängt jedoch von der Position des Stoppcodons in Relation mit dem letzten Exon-Verbindungs-Komplex ab. Befindet sich das Stoppcodon stromabwärts des letzten EJC oder innerhalb von 50 Nukleotiden vor dem letzten EJC, dann findet eine Translation des Proteins ohne Aktivierung des NMD statt. Befindet sich das Stoppcodon mehr als 50 Nukleotide stromaufwärts eines EJC, wird der Nonsense-vermittelte mRNA-Zerfall eingeleitet und die mRNA abgebaut (Lewis, et al., 2003)

Weil ein verändertes Spleißverhalten zu vorzeitigen Stoppcodons und somit via NMD zu einem Abbau der mRNA bei der ersten Translation führen kann, wurde das Spleißverhalten der hier vorgestellten Mutationen näher untersucht.

5.2. Vergleich des Spleißverhaltens der hier untersuchten Mutationen.

5.2.1. *NIS* Mutation c.743T>C, p.V248A

In dem hier untersuchten Genabschnitt *NIS* Exon 5-7 zeigte sich in den Ergebnissen (s. 4.4.1.) ein konsekutives Spleißen der drei vorhandenen Exons *NIS* Exon 5-7 und somit kein verändertes Spleißverhalten trotz der Mutation im Exon 6 und der Vorhersage einer möglichen Beeinflussung des Spleißverhaltens beim Screening mit verschiedenen Programmen (u.a. dem ESE Finder s. Kap. 2.8.).

Da hier jedoch nur ein Ausschnitt des Gens und nicht das Spleißverhalten des kompletten Gens untersucht worden ist, kann es möglich sein, dass die Mutation Einfluss auf weitere, hier nicht untersuchte Spleißstellen hat. Um dies auszuschließen müsste die komplette *NIS* mRNA untersucht werden, jedoch ist das mit den hier verwendeten Methoden aufgrund der Instabilität längerer DNA-Abschnitte in der PCR-Amplifizierung aktuell nicht möglich.

Dennoch kann die Mutation einen Einfluss auf die Proteinstruktur und Funktion haben, da es zu einem Aminosäureaustausch im Protein kommt. Dies wird im Kap. 5.4.1. näher diskutiert.

5.2.2. *NIS* Mutation c.1058+5G>C

Wie schon in den Ergebnissen beschrieben (s. Kap. 4.4.2.) zeigten sich beim Spleißen des Genabschnittes *NIS* Exon 7-10 zwei unterschiedliche Spleißprodukte, die deutlich von dem ursprünglichen Spleißverhalten abweichen. Das Spleißverhalten des Wildtyps ist ein konstitutives Spleißen mit vollständigem Herausspleißen der Introns und der Ligation der aufeinander folgenden Exons (s. Abb. 21, B). Hierdurch ergibt sich ein mRNA Abschnitt der Exons 7-10, der insgesamt 404 Nukleotide lang ist.

Das längere der beiden erhaltenen verschiedenen Spleißprodukte des Genabschnittes *NIS* Exon 7-10 mit der Mutation c.1058+5G>C zeigt ein Herausspleißen des 8. Exons

(s. Abb. 21, C, Abb. 22). Das Exon 9 stellt sich leicht verkürzt da und das Exon 10 fehlt in den sequenzierten Abschnitten.

Jedoch zeigt sich zwischen dem 7. und dem 9. Exon eine Intron Teil-Retention (s. Kap. 5.1.3.) der Introns 7 und 8. Hierbei entstammt der Anteil des 7. Introns dem 5'Ende des 7. Introns und der Anteil des 8. Introns dem 3'Ende des 8. Introns. Die unterschiedliche Nukleotidanzahl der Introns ergibt sich dadurch, dass an der Verbindungsstelle der beiden Introns fünf der vorhandenen Nukleotide sowohl aus dem 7. oder aus dem 8. Intron stammen können.

Da sich die Mutation genau im 5'Spleißbereich des 8. Exons befindet und das 8. Exon herausgespleißt wird, scheint die Erkennung der Spleißstelle oder die Bindung des Spleißosoms an dieser 5'Spleißstelle gestört zu sein. Hierdurch aktivieren sich möglicherweise kryptische Spleißstellen in den Introns 7 und 8, welche zu der erfolgten Intron-Retention in der hier erhaltenen mRNA führen könnte. Hierdurch ergibt sich eine verlängerte mRNA. Außerdem konnte hier nicht nachgewiesen werden, ob das 10. Exon inkludiert wird oder nicht. Hierdurch können weitere Veränderungen des Spleißens der darauffolgenden Exons nicht ausgeschlossen werden. Hierzu wären weitere Untersuchungen mit dem kompletten NIS-Gen und der hier beschriebenen Mutation notwendig.

Das kürzere der beiden erhaltenen verschiedenen Spleißprodukte des Genabschnittes *NIS* Exon 7-10 mit der Mutation c.1058+5G>C zeigt ein Herausspleißen des 8. Und 9. Exons (s. Abb. 21, D, Abb. 23). Außerdem ist das Exon 10 verkürzt. Der Anteil des 10. Exons entspricht dem 3'Ende des 10. Exons. Insgesamt ergibt sich eine im Vergleich zur WT-mRNA verkürzte mRNA.

In dieser mRNA zeigt sich ebenfalls eine Intron Retention (s. Kap. 5.1.3.), allerdings nur des 7. Introns, wobei der Anteil des 7. Introns wie bei der längeren mRNA Variante dem 5'Ende des Introns entspricht. Mit den hier verwendeten Methoden ist es jedoch nicht zu klären, ob die letzten beiden Nukleotide des 7. Introns aus dem 7. Intron oder dem 10. Exon stammen.

Vergleicht man die letzten enthaltenen Nukleotide des 7. Introns der beiden mRNA Varianten, dann scheint das 7. Intron in beiden Varianten an der gleichen Stelle gespleißt und ligiert zu werden, wenn auch mit unterschiedlichen Folgeabschnitten (Anteil des Intron 8 oder Exon 10). Dies deutet auf eine neu aktivierte kryptische Spleißstelle an dieser Stelle des 7. Introns hin, welche in beiden Fällen höchstwahrscheinlich aufgrund der durch die Mutation inaktivierten 5´Spleißstelle des 8. Exons aktiviert wurde.

Die hier festgestellten Veränderungen des Spleißverhaltens der mRNA führen höchstwahrscheinlich zu weiteren Veränderungen im Rahmen der Translation und Proteinfunktion. Aufgrund der inkludierten, nicht kodierenden Intronsequenzen kann es zu der Ausbildung eines Stoppcodons kommen, welches bei einer erfolgreichen Translation in einem trunkierten Protein resultieren würde. Aufgrund der hier durchgeführten Codon-Zählung scheint es ein TGA-Stoppcodon zu geben (s. Abb. 22 und 23).

Durch ein verfrühtes Stoppcodon oder allein durch die Tatsache, dass diese Teile der Introns in der mRNA verbleiben, kann es sein, dass ein *Nonsense-mediated decay* eingeleitet und dadurch diese mRNA abgebaut wird, bevor sie zur Translation verwendet werden kann (s. Kap. 5.1.5.).

Für den Fall, dass diese mRNA nicht abgebaut, sondern komplett ohne Stopp-Codon und ohne Rasterverschiebung translatiert wird, führt die Translation der entsprechenden Intronteile und das Fehlen des 8. Exons oder des 8. und 9. Exons zu einer signifikanten Veränderung der Sekundärstruktur des NIS-Proteins und somit auch zu einer Störung dessen Funktion (s. Kap. 5.4.2.).

Die beiden hier erhaltenen unterschiedlichen Spleißprodukte lassen sich durch die Ausbildung von unterschiedlichen Spleißosomen erklären. An der 5´Spleißstelle des 8. Exons befindet sich im Wildtyp eine GURAGU-Sequenz, an welcher das snRNP U1 des Major Spleißosoms bindet (s. Kap. 5.1.1., 5.1.2. und Abb. 25 und 26). Durch die Mutation wird diese Erkennungssequenz zu GURACU verändert, wodurch das snRNP U1 des Major Spleißosoms nicht mehr gut binden kann und deshalb diese Spleißstelle nicht mehr erkannt wird. Da die Aktivierung und Hemmung von Spleißstellen ebenfalls

von der Bindung der Spleißproteine (s. Abb. 28, hellgrüne Strukturen) abhängt und die weiteren in der prä-mRNA Sequenz vorhandenen Spleiß Enhancer- und Silencersequenzen (s. Kap. 5.1.4.) ansonsten gleichbleiben, verändert sich deren Einfluss auf alle weiteren benachbarten Spleißstellen (s. Abb. 28). So können nun die nächstgelegenen kryptischen Spleißstellen ohne eine GURAGU-Sequenz aktiviert und durch ein Minor Spleißosom (s. Kap. 5.1.2.) gespleißt werden. Je nach Interaktion der SR-Proteine und hnRNPs (s. Kap. 5.1.4. und Abb. 28) können unterschiedliche Spleißstellen aktiviert werden. Anhand der Sequenz der Spleißprodukte (s. Abb. 22 und 23.) wurden solche kryptischen Spleißstellen sowohl im Intron 7 und 8 (längeres Spleißprodukt) als auch im Intron 7 und Exon 10 (kürzeres Spleißprodukt) aktiviert.

In der Literatur finden sich ebenfalls Beispiele von Punktmutationen in 5'SS, wodurch Spleißstellen deaktiviert und daraufhin kryptische Spleißstellen erkannt werden. Bekannt ist dies z.B. bei der β -Thalassämie, einer erblich bedingten Hämoglobinopathie. Hier führt eine Punktmutation in der 5'SS des Intron 1 des *HBB*-Gens zur Deaktivierung derselben. Durch kryptische Spleißstellen werden sowohl verkürzte als auch verlängerte mRNA erzeugt, welche zu inaktiven Proteinen translatiert werden.

Ebenso ist eine Mutation im Intron 2 desselben Gens bekannt, wodurch es zum Beibehalten einer kurzen Intron-Sequenz in der reifen mRNA kommt. In beiden Fällen kommt es zu einer stark reduzierten Hämoglobinsynthese (Cao & Galanello, 2010).

Um mögliche Sekundärstrukturveränderungen und Funktionseinschränkungen durch die hier untersuchten Mutationen näher beschreiben zu können, ist es wichtig, diese mit bereits bekannten und genauer untersuchten Mutationen im *NIS*-Gen zu vergleichen.

5.3. Tertiär und Quartär Struktur des NIS

Die räumliche Struktur des NIS Proteins wurde auf Basis der Struktur des prokaryotischen vSGLT (Sodium-Glucose linked Cotransporter des *V. parahaemolyticus*) durch Sequenz- und Strukturalignment als Modell theoretisch berechnet (s. Kap. 2.7.3., Abb. 9 und Abb. 30). Dieser hat eine zu 32% identische und zu 60% ähnliche Struktur mit dem humanen SGLT1, welcher zur gleichen SLC5-

Familie wie NIS gehört. Mit dem NIS selbst, hat vSGLT eine zu 27% identische und zu 57% ähnliche Struktur wodurch dieses angepasste homologe 3D-Modell des NIS angefertigt wurde. (Portulano, et al., 2014; Ressler, et al., 2009; Faham, et al., 2008)

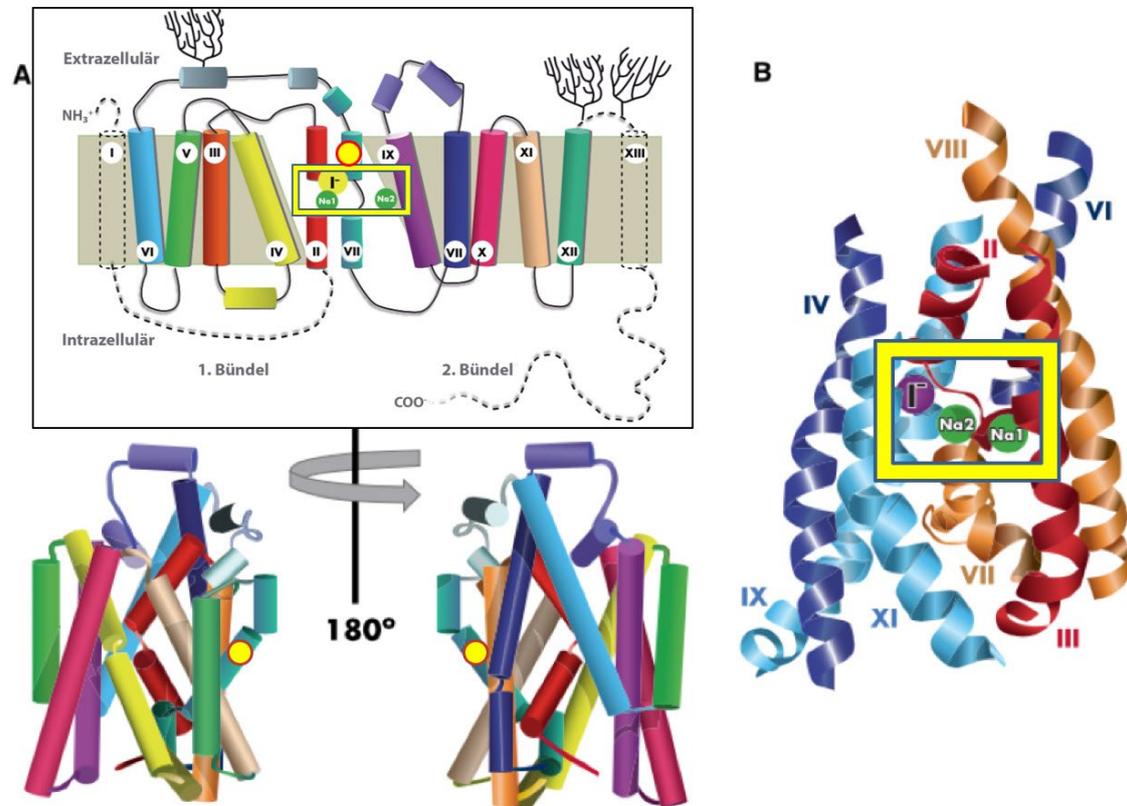


Abbildung 30 Dreidimensionales NIS Homologiemodell

A: Ein dreidimensionales NIS-Homologiemodell wurde durch Sequenz- und Strukturalignment mit vSGLT erstellt (27 % Identität und 57 % Ähnlichkeit) und das Sequenzalignment manuell korrigiert, um die Seitenketteninteraktionen zu verbessern und die Energie zu minimieren. Der für die TMS verwendete Farbcode ist derselbe, der auch für das Sekundärstrukturmodell verwendet wurde (s. kleine Abbildung und Abbildung 9). Die Helices werden durch Zylinder dargestellt. Das Modell ist so ausgerichtet, dass sich das extrazelluläre und das intrazelluläre Milieu oben bzw. unten befinden. Die Amino- und Carboxytermini sowie die TMS I und XIII sind in den dreidimensionalen Referenzstrukturen nicht vorhanden und können daher nicht modelliert werden. Die hier untersuchte Mutation p.V248A ist als kleiner gelber Kreis mit roter Umrandung dargestellt. B: Helixmodell mit Darstellung der Tunnelstruktur (TMS II-III aus dem 1. Bündel in rot und VII-VIII aus dem 2. Bündel in orange) und des Gerüsts (TMS III-V aus dem 1. Bündel in blau und VIII-X aus dem 2. Bündel in cyan). Die übrigen Helices und Schleifen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen. Die zwei Na⁺ und das I⁻ sind an Positionen dargestellt, die aus experimentellen Daten und Molekulardynamikberechnungen abgeleitet wurden (gelber Kasten). Modifiziert nach (Portulano, et al., 2014)

In der Abb. 9 und Abb. 30 A (gelber Kasten) ist ersichtlich, dass vor allem die TMS II und VII für die Bindung des Substrates und des ersten Natrium-Ions und die TMS IX für die Bindung des zweiten Natrium-Ions verantwortlich sind (Portulano, et al., 2014; De la Vieja, et al., 2007). Um den Substrattransport gewährleisten und den Tunnel öffnen und schließen zu können, ist eine Beweglichkeit der verschiedenen TMS

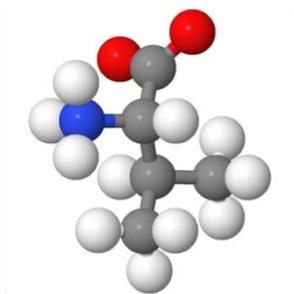
notwendig. Studien haben gezeigt, dass v.a. die IV. und die X. TMS hier eine entscheidende Rolle spielen. (Portulano, et al., 2014; Paroder-Belenitsky, et al., 2011)

Durch diese notwendige Beweglichkeit und die Bereitstellung verschiedener Bindungsstellen im Rahmen der Substraterkennung und des Substrattransportes, kann die Funktion des NIS durch Strukturveränderungen erheblich beeinträchtigt werden, was durch bisher bekannte Mutationen (s. Kap. 5.3.) nachgewiesen wurde. Hierdurch kann auch eine mögliche Funktionseinschränkung durch die hier untersuchte Mutation c.743T>C, p.V248A abgeleitet werden.

5.4. Mögliche Auswirkungen der hier untersuchten Mutationen auf die NIS Funktion

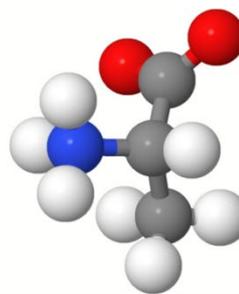
5.4.1. NIS Mutation c.743T>C, p.V248A

Diese Mutation führt, wie im Kap. 2.8. beschrieben zu einem Austausch der Aminosäure Valin mit Alanin an der Position 248 in der Aminosäurekette. Die Mutation befindet sich im 6. Exon, welches für das VII. Transmembransegment codiert (s. Kap. 2.7.2. und 5.4.2., Abb. 32). Die Stelle der Mutation befindet sich am Beginn der VII. TMS (s. Kap. 5.3.).



Valin (Val, V)

- M r = 117,15
- ungeladen
- essentiell
- hydrophob (2,3) (mäßig löslich in Wasser)



Alanin (Ala, A)

- M r = 89,09
- ungeladen
- nicht essentiell
- hydrophob (1,0)(gut löslich in Wasser)

Abbildung 31 Aminosäuren Valin und Alanin

Struktur der Aminosäuren Valin und Alanin im Vergleich, sowie ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften. Beide Aminosäuren sind ungeladen und hydrophob, wobei Alanin besser in Wasser löslich ist. Valin ist im Gegensatz zu Alanin essentiell.

Wie in Abb. 31 sichtbar, ist die Aminosäure Alanin im Gegensatz zu Valin etwas kleiner und auch besser löslich in Wasser. Zwar sind beide ungeladen, jedoch ist

insbesondere eine Tunnelstruktur, die geladene Ionen transportiert, sehr sensibel in Bezug auf kleinste Veränderungen der Struktur oder der chemischen Eigenschaften. Da dieser Aminosäureaustausch sich an vierter Position des VII. TMS (aus extrazellulärer Richtung) und somit zwischen dem Extrazellularraum und der Substratbindungsstelle befindet, kann eine Beeinflussung des Transportes und der Bindung durch die veränderten chemischen Eigenschaften möglich sein, was zu Transportaktivitätsveränderungen führen würde.

Es ist relativ wahrscheinlich, dass sich die Helixstruktur trotz des Aminosäureaustausches an dieser Stelle formen kann, da Alanin keine intervenierenden Seitengruppen besitzt. Außerdem haben manche der strukturverwandten Proteine an dieser Stelle ebenfalls ein Alanin (SMVT (SLC5A6), PutP von *Echerichia coli*) oder Isoleucinmolekül (vSGLT, SGLT1 (SLC5A1), SGLT3 (SLC5A4)) anstelle des Valins, was darauf hindeutet, dass diese Position nicht so stark konserviert ist und kleine Abweichungen in den Seitengruppen möglich sind (Darrouzet, et al., 2014).

Allerdings könnte genau diese fehlende Seitengruppe einen negativen Einfluss auf die Stabilität haben. Durch mögliche Veränderungen der chemischen Eigenschaften könnte ebenfalls der Substrattransport beeinflusst werden, was wiederum zu einer veränderten Aktivität führen könnte (s. Kap. 5.3. und 5.5.).

Um die letztendlich stattfindende Beeinflussung der Struktur und vor allem der Funktion näher bestimmen zu können wären jedoch weitere Untersuchungen mit Transportaktivitätsmessungen notwendig.

5.4.2. NIS Mutation c.1058+5G>C

Bei dieser Mutation ist anhand der nachgewiesenen Spleißveränderung (s. Kap. 4.7.2. und 5.2.2.) eine Funktionsstörung sehr wahrscheinlich. Um die möglichen fehlenden Abschnitte des NIS Proteins näher identifizieren zu können, ist ein Vergleich der kodierten Proteinabschnitte mit den Exons notwendig.

Wie in Abbildung 32 sichtbar, kodiert der hier untersuchte Genabschnitt (*NIS* Exon 7-10) für die Transmembransegmente VIII, IX und X, wobei das 7. Exon den Abschnitt

des VIII. TMS und das 8. Exon den größten Teil des IX. TMS kodiert. Das 9. Exon kodiert noch einen Anteil des IX. TMS und auch die Hälfte des X. TMS, welches vom 10. Exon abgeschlossen wird. Die Mutation selbst befindet sich im Intron 8, 5 Basenpaare nach Exon 8 und liegt somit im Bereich der Spleiß-Donorstelle des Intron 8 (s. Kap. 5.1.1. und 5.2.2.). Da das TMS IX sowohl vom 8. als auch vom 9. Exon geformt wird, ist ein korrektes Spleißen an dieser Stelle wichtig.

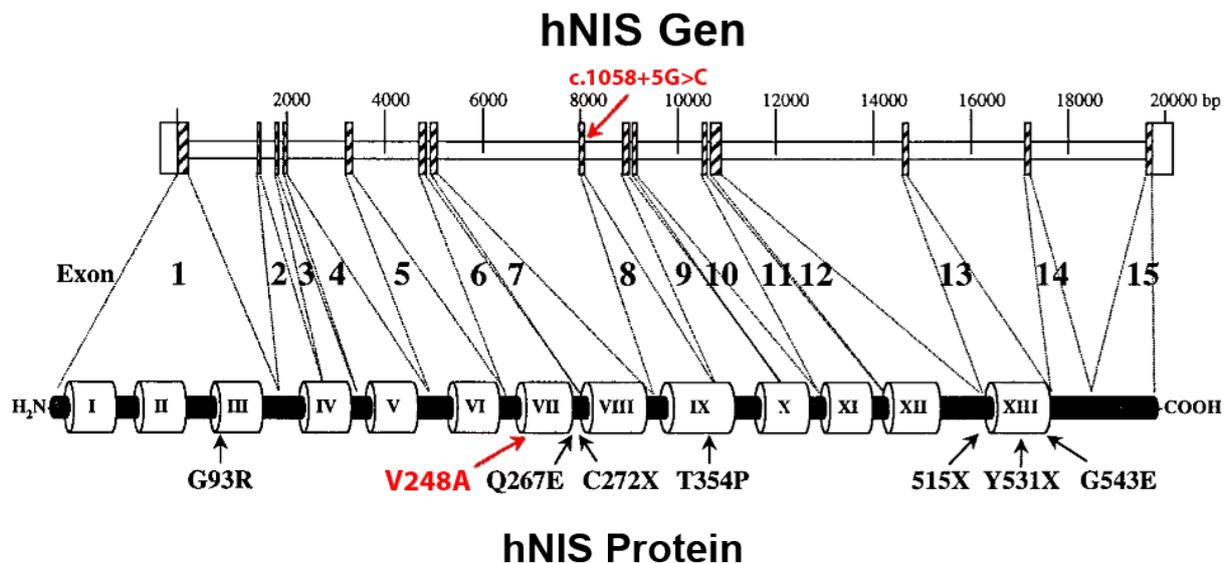


Abbildung 32 *NIS*-Gen mit Lokalisation der Exons und deren codierten Segmenten des *NIS*-Proteins und Position der hier beschriebenen Mutationen, sowie weitere bereits bekannte Mutationen

Die Exons (große arabische Ziffern im humanen (h) *NIS*-Gen werden als linierte Rechtecke dargestellt, die nicht translatierten 3' und 5'-Regionen werden durch leere Rechtecke dargestellt. Die 13 Transmembransegmente werden als Zylinder und mit römischen Ziffern dargestellt. Die Exons sind mit den dazugehörigen Aminosäuresequenzen des *NIS* Proteins durch gestrichelte Linien verbunden. Die Lokalisationen der hier beschriebenen Mutationen ist rot gekennzeichnet, die weiteren Iod-Transport-Defekt Mutationen werden unterhalb des Proteins gezeigt. H₂N = N-Terminus, COOH = C-Terminus. 2000-20000bp = Skala Anzahl Basenpaare des *NIS*-Gens. Modifiziert nach (Levy, et al., 1997; Smanik, et al., 1996)

Aufgrund der zumindest zwei verschiedenen Spleißprodukte, gibt es mindestens drei verschiedene mögliche Varianten des Proteins, welche für die Funktionsanalyse berücksichtigt werden müssen.

Bei der längeren Spleißvariante scheinen das 7. und das 9. Exon komplett zu sein, jedoch fehlt das 8. und das 10. Exon. Somit würde bei erfolgreicher Translation auf jeden Fall der größte Teil der IX. TMS fehlen, welcher für die Bindung des zweiten Natrium-Ions notwendig ist. Abgesehen davon wären die korrekte Faltung des Proteins und der Einbau in die Membran durch diesen fehlenden Teil sehr wahrscheinlich nicht

mehr möglich. Falls das Protein trotz fehlendem Segment noch gefaltet und eingebaut werden könnte, würde die Funktion deutlich beeinträchtigt sein oder sogar entfallen. Relevant für die Funktion des Proteins ist jedoch die hier vorhandene Intron Retention. Hierdurch ändert sich die Primär- und Sekundärstruktur des NIS zwischen dem 7. und dem 9. Exon, wodurch eine korrekte Faltung nicht mehr gewährleistet ist.

Nähere Analysen der enthaltenden Intronabschnitte zeigen keine Rasterverschiebung, jedoch ergibt sich ein TGA-Stoppcodon an 20. Position des Introns 7 (s. Abb. 22). Somit liegt die Vermutung nahe, dass diese Spleißvariante zu einem trunkierten Protein und dadurch definitiv zu einem Funktionsverlust führt.

Bei der kürzeren Spleißvariante (s. Abb. 20 D) fehlen sowohl das 8. und das 9. Exon und das 10. Exon ist nur mit den 42-44 letzten Basenpaaren vorhanden. Die exakte Anzahl der Basenpaare des Exon 10 lässt sich mit den hier verwendeten Methoden nicht näher bestimmen, da zwei Basenpaare sowohl ein Teil des Exon 10 als auch des Intron 7 sein könnten. Aufgrund der fehlenden Exons 8 und 9 würde bei erfolgreicher Translation auf jeden Fall das IX. TMS und ein Teil des X. TMS fehlen. Ebenfalls befindet sich hier eine Intron Retention ohne Rasterverschiebung, jedoch mit einem TGA-Stoppcodon interessanterweise an derselben Position wie bei der längeren Variante (s. Abb. 23). Somit führt diese Spleißvariante höchstwahrscheinlich ebenfalls zu einem trunkierten Protein und dadurch zu einem Funktionsverlust.

Die dritte Möglichkeit des Einflusses dieser Mutation auf die NIS-Funktion ist ein fehlender Aufbau des Proteins aufgrund eines Nonsense-mediated decays (s. Kap. 5.1.5.). Gerade durch das Auftreten der Stoppcodons im enthaltenen Intron 7 ist die Wahrscheinlichkeit dieser Möglichkeit erhöht. Dieser Fall würde ebenfalls zu einem kompletten Funktionsverlust aufgrund eines nicht translatierten NIS führen.

Für den endgültigen Nachweis eines trunkierten oder fehlenden Proteins und dem Nachweis des Funktionsverlustes wären jedoch weiterführende Versuche im Zellmodell notwendig (s. Kap. 5.7.), der Nachweis eines fehlenden Iodidtransportes *in vivo* (s. Kap. 5.6. und 5.7.) oder der fehlende Nachweis des NIS in einer Schilddrüsengewebeprobe der betroffenen Patienten.

Ein Vergleich dieser Mutationen mit bereits bekannten Mutationen des NIS und deren Auswirkungen auf die Funktion des NIS scheint die die Hinweise auf die hier zu erwartende Funktionseinschränkung zu bestätigen.

5.5. Vergleich mit den bereits bekannten Mutationen im NIS-Gen

Bisher wurde das Wissen über die Beziehung zwischen Struktur und Funktion von NIS hauptsächlich aus Studien über NIS-Genmutationen gewonnen, die zu angeborenen Iodtransportdefekten (ITD) führen. In der Literatur wurden bislang 24 NIS-Mutationen mit ITD beschrieben (-54C>T, G18R, G51fs, V59E, G93R, R124H, Q267E, V270E, C272X, Y324LfsX12, D331N, Y348D, T345P, G395R, G421R, S509RfsX6, R516X, Y531X, G543E, S547R, DelM143-Q323, DelV287-G288, DelA439-P443, c.1326A>C). Sie führen zu Aminosäuresubstitutionen mit resultierenden Funktionsveränderungen oder zur Entstehung von Stoppcodons, Rasterverschiebungen (*frame shift*) oder Proteinen mit partiellen Deletionen, was zur Synthese verkürzter Proteine führt (Geysels, et al., 2022; Stoupa, et al., 2022; Reyna-Neyra, et al., 2021; Stoupa, et al., 2021; Zhang, et al., 2021; Stoupa, et al., 2020; Martin, et al., 2019; Martin & Nicola, 2016; Darrouzet, et al., 2014; Portulano, et al., 2014).

Diese Mutationen befanden sich hauptsächlich in den kodierenden Bereichen des NIS-Genes. Aufgrund der komplexeren Struktur mit 13 Transmembransegmenten und die dadurch ermöglichte Transportfunktion des NIS, resultieren die meisten beschriebenen Mutationen in einem nicht-funktionalen Protein, dass teilweise entweder nicht korrekt oder überhaupt nicht in die Zellmembran eingebaut wird oder im Falle z.B. der Q267E Mutation nur eine moderate Aktivität zeigt (s. Abb. 33).

Einige dieser Mutationen (in Abb. 33 rot umrandet) wurden auf molekularer Ebene näher untersucht und die Auswirkungen verschiedener Aminosäure-Substitutionen an diesen Positionen getestet. Hierbei fiel auf, dass bei einigen dieser Mutationen ein Austausch der Aminosäure mit leichter Veränderung der Seitenkette, insbesondere bei Mutationen an positiv geladenen Seitenketten zu einer deutlichen Abnahme der Transportaktivität führte, während sich bei Mutationen an negativ geladenen Seitenketten der Km-Wert für I⁻ im Vergleich zu WT-NIS erhöhte.

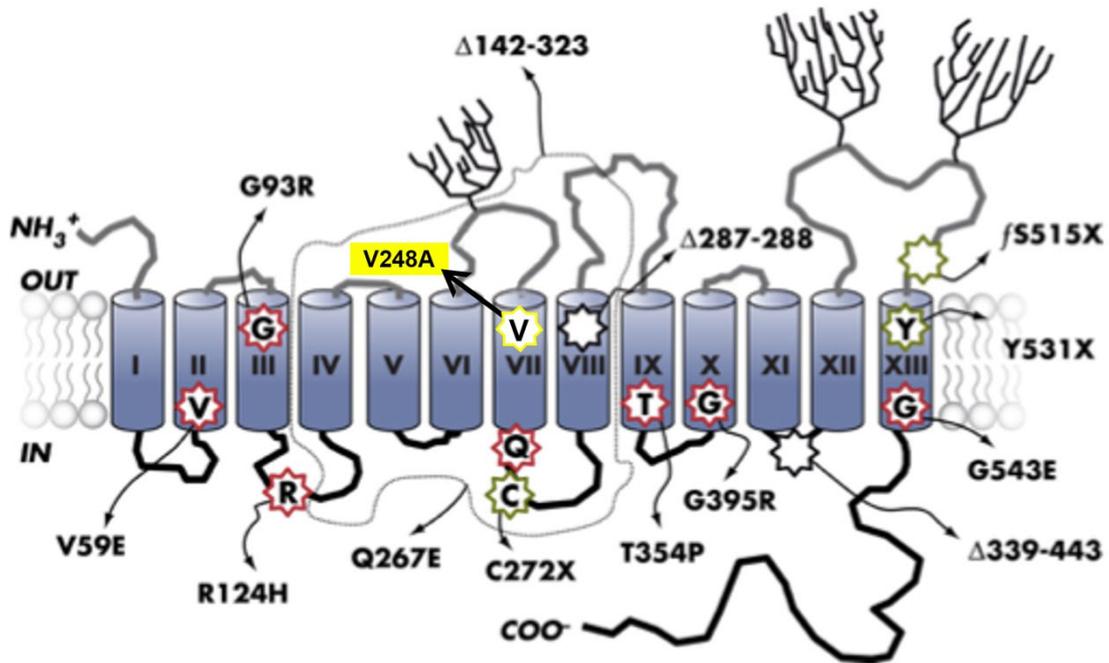


Abbildung 33 Experimentell getestetes NIS-Sekundärstrukturmodell mit einigen der bekannten Mutationen

(modifiziert nach Portulano, et al., 2014) Blaue Zylinder stehen für TMS, graue Linien für extrazelluläre Segmente, schwarze Linien für intrazelluläre Segmente und Zweige für N-gebundene Glykosylierungsstellen (N225, 485 und 497). NIS-Mutationen, die bei Patienten mit ITD identifiziert wurden, sind mit dem Aminosäurecode aus einem Buchstaben angegeben. Die rot umrandeten Buchstaben (V59E, R124H, Q267E, T354P, G395R, G543E und Δ 339-443) wurden auf molekularer Ebene untersucht. Schwarze Sterne und Δ weisen auf Deletionen und grün umrandete Buchstaben mit X-Termination auf trunkierte Proteine hin. Die gelb umrandete/hinterlegte Position zeigt die hier untersuchte Mutation V248A.

Unterschied sich die ausgetauschte Aminosäure jedoch deutlich von der ursprünglich vorhandenen Aminosäure in Struktur oder chemischen Eigenschaften, dann führte dies zu einem nicht funktionierenden Protein (Portulano, et al., 2014).

Dies zeigt, wie sensibel eine Tunnelproteinstruktur wie der NIS, auf kleinste Veränderungen der Struktur oder der chemischen Eigenschaften, insbesondere in für den Substrattransport relevanten Bereichen reagieren kann.

Die Mutation V59E in der Nähe der zytosolischen Seite des TMS II führt zu einem vollständigen Verlust der NIS-Funktion. Auch wirken sich geladene Aminosäurereste oder ein Prolinrest an dieser Position direkt auf die Proteinfunktion aus, während Ersetzungen durch neutrale, helixfördernde Reste gut toleriert werden und keine Auswirkungen auf die I⁻ oder Na⁺ Km-Werte beobachtet wurden. Ebenfalls führte die Substitution von Q267 durch andere geladene Reste immer zu einem inaktiven Transporter, während neutrale Aminosäuren (wie Asparagin oder Alanin) zu einer

teilweise vorhandenen Transportaktivität führen (30 % bzw. 20 % der WT-NIS-Aktivität) (Portulano, et al., 2014; Rodriguez, et al., 2002).

Dies könnte auch bei der hier untersuchten Mutation V248A der Fall sein, da hier der Austausch zu einer neutralen, kleineren Aminosäure erfolgt. Inwiefern und ob der Transport beeinträchtigt wird, müsste jedoch wie schon in Kap. 5.4.1. erwähnt wurde noch weiter untersucht werden (s. auch Kap. 5.7.).

Im Gegensatz dazu führten die bisher beschriebenen Deletionen Del439-443 (Opazo, et al., 2008) und Del287-288 (Mitchell & Klein, 2004), sowie Del142-323 (Portulano, et al., 2014) (in Abb. 33 mit Δ markiert) allesamt zu nicht funktionierenden Proteinen.

Durch das Herausspleißen der Exons 8 bzw. 8 und 9 bei den hier nachgewiesenen Spleißvarianten der Mutation (c.1058+5G>C), würde eine erfolgreiche Translation somit ebenfalls zu einem nicht funktionierenden Protein führen, da auf jeden Fall das IX. bzw. das IX. und fast das komplette X. Transmembransegment fehlen würde (Abb. 32). Die Tatsache, dass die Punktmutationen T354P im IX. TMS (Fujiwara, et al., 1997) und G395R im X. TMS (Morreale de Escobar, et al., 2004) zu einem kompletten Funktionsverlust führen weisen ebenfalls daraufhin, dass diese Regionen für die NIS-Funktion relevant sind.

Da bei den hier nachgewiesenen Spleißvarianten der Mutation (c.1058+5G>C) jedoch ein TGA-Stoppocodon in der Intron 7 Retention vorhanden ist, führt dieses im Falle einer erfolgreichen Translation ohne *Nonsense-mediated decay* (s. Kap. 5.1.5.) zu einem trunkierten Protein nach dem VIII. TMS.

In der Literatur wird u.a. über drei Mutationen im *NIS*-Gen berichtet, durch die es zu einem trunkierten Protein kommen könnte (in Abb. 33 grün umrandet). Es zeigt sich schon ein kompletter Funktionsverlust bei einem erst an Position Y531X in der XIII. TMS trunkierten, und im Vergleich zu den hier beschriebenen Spleißvarianten längeren Protein. Somit liegt der Umkehrschluss nahe, dass ein kürzeres Protein ebenfalls keine Transportfunktion aufweisen wird.

Dies ist auch bei der Mutation C272X, welche in einem TGA-Stoppocodon resultiert, der Fall. Die Mutation befindet sich im Exon 6, im Bereich der 4. Intrazellulären Schleife und führt zu einem um mehr als die Hälfte verkürzten NIS-Protein mit im Zellversuch

nicht nachweisbarer Iodid-Transport Aktivität (Pohlenz, et al., 1998; Pohlenz, et al., 1997).

Hierdurch bestätigt sich die Annahme, dass diese hier beschriebene Mutation (c.1058+5G>C) durch die Spleißveränderungen ebenfalls wie die bereits bekannten trunkierten Proteine zu einem kompletten Funktionsverlust und dadurch zu einem angeborenen Iodtransportdefekt (ITD) führen könnte.

Aufgrund der autosomal rezessiven Vererbung zeigen die heterozygoten Eltern der hier untersuchten Patientin mit der Mutation (c.1058+5G>C) keine klinischen Symptome, da das gesunde Allel die NIS-Funktion aufrechterhält. Der Unterschied der Funktionsunterschiede zwischen heterozygoten und homozygoten Mutationen hat deutliche Auswirkungen auf die klinische Relevanz dieser Mutation, welche im nachfolgenden Kapitel 5.6. näher im Detail diskutiert wird.

5.6. Klinische Relevanz der hier untersuchten Mutationen

Aufgrund der in 5.2.2. beschriebenen Spleißveränderungen der Mutation c.1058+5G>C und der daraus höchstwahrscheinlich resultierenden Funktionseinschränkung (s. Kap. 5.4.2.), kann insbesondere im Vergleich mit anderen, bereits bekannten Mutationen (s. Kap. 5.5.) von einem Iodtransportdefekt (ITD) mit resultierender angeborener Hypothyreose ausgegangen werden.

Die andere, ebenfalls hier untersuchte Mutation c.743T>C, V248A führt zwar zu keinen hier nachweisbaren Spleißveränderungen (s. Kap 5.2.1.), könnte jedoch durch den erfolgten Aminosäureaustausch über mögliche Struktur und Funktionseinschränkungen (s. Kap. 5.4.1. und 5.5.) zu einer Veränderung oder Einschränkung des Iodtransportes und somit ebenfalls zu einer angeborenen Hypothyreose führen. Allerdings besteht hier jedoch eine heterozygote Mutation, weshalb beim alleinigen Vorliegen dieser Mutation, das gesunde Allel eine ausreichende NIS-Funktion gewährleisten könnte (s. Kap. 2.6.2.).

Im Falle einer angeborenen Hypothyreose profitieren die betroffenen Kinder von einem gut funktionierenden Neugeborenen-Screening, um schwerwiegende Folgeschäden wie Wachstumsstörungen und Kretinismus zu vermeiden (s. Kap. 2.5. und 2.6.4.).

Hierbei ist wichtig, dass die Hypothyreose so früh wie möglich erkannt und behandelt wird (Krude, 2010).

Zeigen sich im Neugeborenen Screening auffällige Werte, erfolgt idealerweise eine sofortige Information des Labors an den Einsender, sodass möglichst zeitnah eine weitere klinische Diagnostik und gegebenenfalls eine Behandlung eingeleitet werden kann. Im Falle nachgewiesener erhöhter TSH-Werte, erfolgt eine Blutabnahme mit Untersuchung von TSH, T_3 und T_4 im Serum. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass es durch eine zu frühe Blutentnahme < 36 Lebensstunden, Iodkontakt des Kindes durch Desinfektion, Kontrastmittel oder Medikamente oder durch eine Thyreostatikaeinnahme der Mutter zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann. Ebenfalls können Schilddrüsenantikörper der Mutter zu einer initialen Hypothyreose führen. Im Gegensatz dazu können Operationen und Intensivtherapie, die Gabe von FFP (fresh frozen plasma), (Austausch)Transfusionen oder die Gabe von Dopaminen und Steroiden zu falsch negativen Ergebnissen führen. Auch ist wichtig, dass das Blut nicht in ein EDTA-Röhrchen abgenommen wird, da dies in falsch negativen Ergebnissen resultieren kann. (Krude, 2010; Lindner, et al., 2006)

Neben der Bestimmung des TSH, fT_4 und fT_3 ist auch noch eine weitere Diagnostik durchzuführen um die Ursache der angeborenen Hypothyreose zu klären. So dient eine Schilddrüsen Sonographie zum Nachweis von Schilddrüsen Gewebe (inklusive Größenangaben), um eine eventuelle Dys- oder Agenesie auszuschließen. Ebenfalls kann eine Szintigraphie mit Radioiod durchgeführt werden, um ggf. ektopes Schilddrüsen Gewebe zu identifizieren und festzustellen ob eine Iodaufnahme erfolgt. Zur weiteren Funktionsuntersuchung kann auch eine Szintigraphie mit Pertechnetat ($^{99m}TcO_4^-$) erfolgen, da hierdurch nicht eine Funktion des NIS festgestellt werden kann, sondern auch weitere Schritte der Schilddrüsenhormonbiosynthese überprüft werden können. Bei normal großer Schilddrüse sollte nach maternalen blockierenden TSHR-Antikörper gesucht werden, um eine autoimmunbedingte Hypothyreose auszuschließen. Ebenfalls sollte eine perinatale Iodkontamination ausgeschlossen werden, da diese eine transiente Hypothyreose auslösen kann. Besteht der Verdacht seltener syndromaler Formen der Hypothyreose sollten auch diese weiter abgeklärt werden. (Krude, 2010)

Bestätigt sich eine angeborene Hypothyreose durch erniedrigte T₄ Werte, sollte der Behandlungsbeginn möglichst innerhalb der ersten 14 Lebenstage mit einer L-Thyroxin Dosis von 10µg pro Kg KG erfolgen. Bei schwerer Hypothyreose mit Athyreose sollte eine Dosis von 15 µg pro Kg Körpergewicht gewählt werden, um die im Verlauf möglicherweise auftretenden IQ-Defizite oder eine Innenohrschwerhörigkeit zu reduzieren. Ebenfalls ist eine lebenslange Kontrolle der Schilddrüsenparameter und eine Anpassung der Medikation an Wachstumsphasen und Entwicklungsschübe notwendig. Auch sind mögliche Resorptionsstörungen des verabreichten L-Thyroxin durch z.B. Sojamilch zu beachten. (Krude, 2010; Conrad, et al., 2004)

Diesbezüglich wäre eine weitere klinische Abklärung hier untersuchten Patientinnen mit Einsicht in die Neugeborenen Screenings und initialen Untersuchungsergebnissen interessant, um die Schwere der angeborenen Hypothyreose und den Behandlungsverlauf mit der weiteren Entwicklung der Kinder vergleichen zu können.

In Studien mit *NIS*-Knockout-Mäusen (Ausschaltung des Exon 6 und 7) wurde gezeigt, dass *NIS* weder in der Schilddrüse, noch im Magen oder den Speicheldrüsen exprimiert war. In der Szintigraphie konnte eine Aufnahme von Pertechnetat ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) nicht nachgewiesen werden. Im Serum zeigte sich bei minimaler Iodzufuhr kein T₄ Spiegel und nur geringe T₃ Spiegel, was auf eine geringe stattfindende Schilddrüsenhormonbiosynthese trotz fehlendem *NIS* hindeutet. Durch eine extrem hohe orale Iodzufuhr wurde die Menge der Schilddrüsenhormonbiosynthese gesteigert und normale T₃ Werte bei erniedrigtem T₄ und erhöhtem TSH erreicht. Somit wurde der Nachweis erbracht, dass Iod auch anderwärtig in die Schilddrüse gelangen kann. In der Gewichtsentwicklung zeigte sich keine Einschränkung, aufgrund der weiterhin bestehenden hypothyreoten Stoffwechsellage entwickelten die *NIS*-Knockout-Mäuse jedoch eine Struma. (Ferrandino, et al., 2017)

Somit könnte eine extrem hohe Iodzufuhr eine klinische Hypothyreose und deren Folgen mildern, was klinisch auch bei mehreren Patienten mit *NIS*-Mutationen beobachtet werden konnte (De la Vieja, et al., 2007; Wolff, 1983; Toyoshima, et al., 1977), jedoch sind sowohl die notwendige Menge als auch mögliche Nebenwirkungen noch nicht ausreichend untersucht und die Substitution mit L-Thyroxin deutlich effektiver und besser einstellbar.

Durch die Expression von NIS in anderen Geweben wie bereits in Kap. 2.7.1. und Abb. 7 beschrieben, können Mutationen des NIS mit Iodtransportdefekten (ITD) weitere Auswirkungen trotz behandelter Hypothyreose auf den Körper haben.

So kann z.B. durch die fehlende Funktion des NIS die Iodaufnahme aus dem Darmlumen in die intestinalen Zellen deutlich verringert werden und dadurch ein Iodmangel im Körper entstehen. Durch die Substitution von L-Thyroxin würde sich dieser allerdings nicht so gravierend auswirken, da L-Thyroxin im Körper u.a. in das aktivere T₃ deiodiert und somit dem Körper wieder Iod zur Verfügung gestellt wird (s. Kap 2.4.).

Weitere Funktionseinschränkungen des NIS können sogar *in vivo* gemessen werden. Zum einen ist dies durch die Sekretion von Iod in den Speichel möglich, wobei sich NIS in den Speicheldrüsenzellen an der basolateralen Membran befindet, um das Iod in den Zellen vor der Sekretion konzentrieren zu können. Ist der Iodtransport z.B. durch eine genetische Mutation, welche zu Funktionseinschränkungen des NIS führt gestört, zeigt sich dies in signifikant erniedrigten Iodkonzentrationen im Speichel. Durch Messung derselben im Speichel kann somit durch bekannte Relationen zur Iodplasmakonzentration eine Aussage zur Funktion des NIS getroffen werden (Harden, et al., 1968).

Dies könnte bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten überprüft werden, um die vermutete NIS-Funktionsstörung bei der Mutation c.1058+5G>C zu bestätigen und bei ihren Eltern den Nachweis zu erbringen, dass eine Heterozygotie noch zu einem ausreichenden Iodtransport führt, wie in Kap. 5.5. vermutet wird. Ebenfalls könnte hierdurch ein schneller klinischer Nachweis erfolgen, ob die Mutation c.743T>C, p.V248A ebenfalls zu einer signifikanten Iodtransportstörung führt oder nicht.

Eine genau Bestimmung der Iodversorgung ist nicht so einfach, da viele Faktoren eine Rolle spielen. So kann z.B. die Iodkonzentration im Urin gemessen werden, jedoch unterliegt sie oft größeren Schwankungen. Diese Methode wird vielerorts zur Bestimmung von Iodmangel(gebieten) verwendet (Köhrle & Brabant, 2010). Durch die Expression von NIS in der Niere und Messung des Verhältnisses zwischen der Iodkonzentration im Urin und im Plasma könnte nachgewiesen werden, ob eine bekannte NIS-Funktionsstörung einen Einfluss auf die Iodausscheidung hat. Beide

Patienten standen leider für diese Arbeit weder für eine Speichelprobe, noch für eine Messung des Iods im Urin zur Verfügung.

Aufgrund des Vorhandenseins des NIS in Hodengewebe könnte eine Funktionseinschränkung desselben möglicherweise zu einer Einschränkung der Fertilität führen, jedoch ist dies noch nicht ausreichend untersucht worden. Da die hier untersuchten Patienten allesamt weiblich sind, wäre dies erst für ihre männlichen Nachkommen oder Geschwister von Relevanz, falls diese Träger einer homozygoten Mutation sind.

Für die hier untersuchten Patientinnen ist jedoch im Falle einer späteren Schwangerschaft die mögliche Funktionseinschränkung des NIS im Plazenta- und laktierenden Brustdrüsengewebe (Tazebay, et al., 2000) von größerer Relevanz, da es dadurch zu einer Unterversorgung des ungeborenen Kindes und des Neugeborenen mit Iod und somit trotz möglicherweise funktionierender Schilddrüsenhormonbiosynthese bei heterozygoten Nachkommen zu insbesondere neurologischen Entwicklungseinschränkungen kommen könnte. Da Iod in den laktierenden Milchdrüsen via NIS in die Milch abgegeben wird, könnte eine Funktionseinschränkung des NIS zu deutlich erniedrigten und nicht mehr ausreichenden Iodkonzentrationen in der Muttermilch führen. In diesem Fall wäre eine Iodsubstitution bei einem vollgestillten Säugling oder eine Muttermilchersatznahrung empfehlenswert.

Somit haben die hier beschriebenen Mutationen eine deutliche klinische Relevanz für die in dieser Arbeit untersuchten Patientinnen, da insbesondere bei der Patientin 2, sowie dem Geschwisterkind mit der Mutation c.1058+5G>C von einer Iodtransportstörung und daraus resultierenden Funktionseinschränkungen aller NIS exprimierender Gewebe ausgegangen werden kann.

5.7. Ausblick

Zur genaueren Charakterisierung der möglichen Funktionseinschränkungen der hier beschriebenen Mutationen wären weitere experimentelle Untersuchungen notwendig. Ideal wäre die Untersuchung von Schilddrüsengewebeproben der hier vorgestellten Patientinnen. Da jedoch für eine Schilddrüsenbiopsie oder Operation keine

medizinische Indikation für die Patienten bestand, wurde dies nicht veranlasst. Somit müssten die weiteren experimentellen Untersuchungen an Zellmodellen erfolgen.

Wie schon bei den in Darrouzet et al. beschriebenen bereits erfolgten molekularen Untersuchung der Mutationen V59E, G93R, R124A, Q267E und T354P könnte auch die Auswirkung der hier beschriebenen Mutation V248A molekular näher untersucht und die Iod-Transportaktivität bestimmt werden.

Hierzu könnten die Mutationen c.743T>C, V248A und c.1058+5G>C mit Hilfe des CrispR/Cas Systems gezielt in NIS exprimierende Zellen (z.B. HeLa, nach Untersuchungen von Dr. Pia Hermanns) eingebracht werden.

Das *Genome Editing* kann mit Hilfe von *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) und Cas 9 Protein erfolgen (s. Abb. 31)

Hierzu bindet das Cas Protein an die *Guide RNA* (gRNA) und an die komplementäre Sequenz zur gRNA in der CRISPR Zielsequenz der DNA und der darauffolgenden *Protospacer-adjacent motif*-Sequenz (PAM). Dadurch wird dieser Teil der DNA durch einen Teil der gRNA ersetzt. Die gRNA enthält in der Matrize die Mutationen, die bei den beiden Patientinnen, detektiert wurden. Die danach erfolgende Mismatch-Reparatur führt somit zum Einbau der in der gRNA enthaltenen Mutation an der gewünschten Stelle.

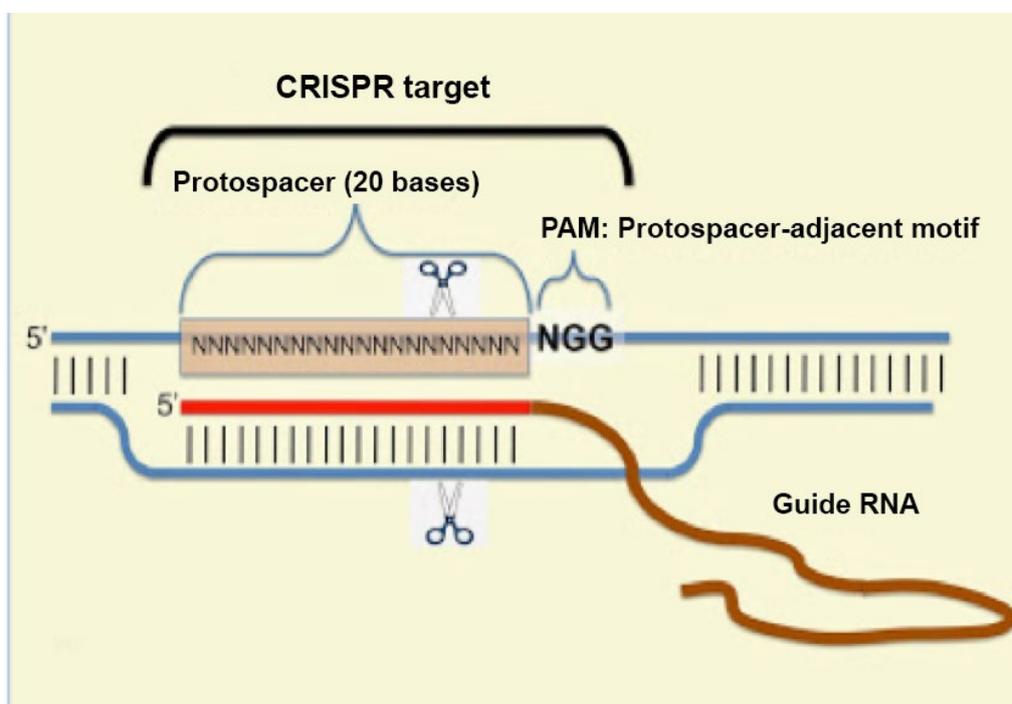


Abbildung 34 CRISPR/CAS 9 System

Die Guide RNA besitzt eine komplementäre Version des Protospacers mit 20 Basenpaaren und bindet an die CRISPR Zielsequenz (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), welche auch

das PAM (Protospacer-adjacent motif) beinhaltet. Je nach Modifizierung der Guide RNA können somit Genveränderungen gezielt an diese Stelle eingefügt werden. 5' = 5' Ende der DNA und der RNA. Modifiziert nach (Mortlock, 2014).

Wenn ein Einbau der hier untersuchten Mutationen in NIS exprimierenden Zellen durch die o.g. Methoden erfolgreich durchgeführt werden kann, könnte das komplette *NIS* Transkript, das von den Zellen exprimiert wird, isoliert und sequenziert werden.

So könnte z.B. festgestellt werden, ob die Mutation c.743T>C, p.V248A durch Interaktionen mit anderen Spleißenzymen in hier nicht untersuchten Bereichen trotzdem zu einer Spleißveränderung führt. Ebenfalls können dann Untersuchungen zum korrekten Proteinaufbau und Targeting erfolgen, z.B. via Kopplung an photosensitive Rezeptoren, sowie der Einbau des NIS in die Membran via Immunohistochemie und Western Blot überprüft werden.

Erfolgt der Einbau in die Zellmembran, könnte dann die Transportaktivität z.B. via patch-clamp Technik gemessen werden.

Ebenfalls könnte bei der Mutation c.1058+5G>C auch das Verhalten des wahrscheinlich trunkierten NIS-Proteins untersucht und mit Hilfe des Western Blots und einem NIS spezifischen Antikörper nachgewiesen werden, ob ein trunkiertes Protein hergestellt, oder vielleicht doch über den Nonsense-mediated decay vor der Translation abgebaut wird.

Insbesondere der Nachweis des vermuteten Funktionsausfalls des NIS bei der Mutation c.1058+5G>C durch die hier gezeigten Spleißveränderungen, kann eine Auswirkung auf weitere Mutationsscreenings haben.

Bisher wurden hauptsächlich die kodierenden Bereiche der Proteine auf Mutationen untersucht. Hier führt jedoch eine Mutation im nicht kodierenden Bereich zu einer Spleißveränderung mit höchstwahrscheinlich nachfolgendem Funktionsverlust des Proteins. Somit sollten bei zukünftigen Mutationscreenings auch die Untersuchung weiterer nicht kodierender, insbesondere für das Spleißen relevanter Bereiche (s. Kap. 5.1) mit in Betracht gezogen werden, falls in den kodierenden Bereichen keine Mutation detektiert wurde.

Abgesehen davon könnte durch weitere Untersuchungen an NIS-Knockoutmäusen herausgefunden werden, ob ggf. die Fertilität bei nicht exprimierten NIS eingeschränkt ist. Auch könnte die Entwicklung der Mausfeten der NIS-Knockout-Mäuse auf

Einschränkungen der Iodversorgung durch die Plazenta und dadurch ggf. retardierter Entwicklung der Feten untersucht werden. Ebenfalls könnte der Iodgehalt in der NIS-Knockout Mäusemilch gemessen und dadurch Rückschlüsse auf eine mögliche Iodunterversorgung bei vollgestillten Kindern von Müttern mit afunktionalem NIS erlauben.

Insgesamt wird die stetig voranschreitende Forschung in den folgenden Jahren zu weiteren Erkenntnissen über den Aufbau, die Struktur und die Funktion des NIS in verschiedenen Geweben, sowie zur Neuentdeckung weiterer Mutationen führen.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde bei zwei Patientinnen mit einer angeborenen Hypothyreose, zwei bisher noch nicht beschriebenen Mutationen im *SLC5A5*-Gen, c.743T>C, p.V248A und c.1058+5G>C identifiziert und das Spleißverhalten näher untersucht. Im Rahmen der experimentellen Arbeit wurden zwei unterschiedliche pathogene molekulare Ursachen identifiziert, die zu einem Funktionsverlust des NIS aufgrund der detektierten Mutationen führen oder führen könnten.

So zeigte die Mutation c.743T>C, p.V248A im Experiment kein verändertes Spleißverhalten, aber *in silico* Analysen legen nahe, dass die Mutation aufgrund einer Strukturveränderung des NIS Proteins zu einem Funktionsverlust führt. Es ist jedoch auch möglich, dass es trotzdem zu Spleißveränderungen kommt, da hier nur ein kleiner Abschnitt der NIS genomischen Gensequenz rund um die Mutation, nämlich NIS Exon 5-7 untersucht wurde. So könnte diese Mutation auch zur Störung von möglichen Interaktionen mit anderen Bereichen des NIS-Gens oder anderer trans Faktoren während des Spleißens führen.

Bei korrektem Spleißen könnte jedoch eine Veränderung der chemischen Eigenschaften aufgrund der Position der Mutation im Tunnelbereich des NIS-Proteins auf die Transportaktivität auswirken.

Aufgrund der vorhandenen Heterozygotie der Patientin, wäre jedoch eine ausreichende NIS-Funktion durch das gesunde Allel zu erwarten, vorausgesetzt es bestehen keine weiteren Mutationen (bisher nicht detektiert), welche durch Interaktionen zu einem Funktionsverlust beider Allele führen könnten.

Im Gegensatz dazu führte die Mutation c.1058+5G>C zu deutlichen Spleißveränderungen mit partieller Intron-Retention und Exon-Skipping. Außerdem wurden im Zellexperiment mindestens zwei verschiedenen Spleißvarianten detektiert. Hierdurch kann eine korrekte Faltung und Funktion des Proteins nicht mehr gewährleistet werden. Aufgrund des Auftretens eines Stoppcodons in der Intron-Retention nach dem 7. Exon ist im Falle einer erfolgreichen Translation die Bildung eines trunkierten Proteins wie bei den bereits beschriebenen Mutationen (C272X, S515X und Y531X) wahrscheinlich. Als Alternative dazu wäre auch ein Nonsense-mediated decay der RNA mit fehlender Proteintranslation möglich. Um dies nachzuweisen sind ebenfalls weiterführende Untersuchungen notwendig. Insgesamt

zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, dass die Mutation durch ein verändertes Spleißverhalten die Ursache für die angeborene Hypothyreose der beiden untersuchten Geschwister ist.

Aufgrund der signifikanten Auswirkungen der Mutation c.1058+5G>C auf das Spleißverhalten und die Funktion des NIS trotz ihrer Position im nicht kodierenden Bereich des NIS-Gens, kann dies zu einer Veränderung im Vorgehen von zukünftigen Mutationsscreenings führen, da auch Mutationen in nicht kodierenden Bereichen in Betracht gezogen und ggf. näher untersucht werden sollten.

Abschließend konnte bei der Patientin mit der Mutation c.743T>C, p.V248A zwar eine molekulare Ursache für eine mögliche Funktionseinschränkung des NIS identifiziert werden, jedoch ist diese heterozygote Mutation aufgrund eines gesunden Allels höchstwahrscheinlich nicht die alleinige Ursache für die angeborenen Hypothyreose und es müssten nach Interaktionen mit anderen Genen oder weiteren Mutationen gesucht werden.

Im Gegensatz dazu konnte bei der Patientin mit der Mutation c.1058+5G>C eine Veränderung des Spleißverhaltens als Ursache für die angeborene Hypothyreose bewiesen werden.

7. Literaturverzeichnis

- Aycan, Z. et al., 2017. Digenic DUOX1 and DUOX 2 mutations in cases with congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.*, Band 102, pp. 3085-3090.
- Benecke, H., 2004. *Deutsche National Bibliothek*. [Online] Available at: <https://d-nb.info/975755609/34> [Zugriff am 29 Juni 2022].
- Benninghoff, A. & Drenckhahn, D., 2004. *Anatomie*. 16. Auflage, Band 2 Hrsg. München: Urban & Fischer bei Elsevier.
- Berget, S. M., Moore, C. & Sharp, P. A., 1977. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(8), p. 3171–3175.
- Boron, W. & Boulpaep, E., 2016. *Medical Physiology*. 3rd Edition Hrsg. s.l.:Elsevier.
- Boron, W. & Boulpaep, E., 2020. *Concise Medical Physiology*. 1st Hrsg. s.l.:Elsevier.
- Brow, D. A., 2002. Allosteric cascade of spliceosome activation. *Annu Rev Genet*, Band 36, pp. 333-60.
- Cao, A. & Galanello, R., 2010. Beta-thalassemia. *Genetics in Medicine.*, 12(2).
- Chang, Y. F., Imam, J. S. & Wilkinson, M. F., 2007. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem*, Band 76, pp. 51-74.
- Chow, L. T., Roberts, J. M., Lewis, J. B. & Broker, T. R., 1977. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell.*, 12(1), pp. 1-8.
- Conrad, S. C., Chiu, H. & Silverman, B. L., 2004. Soy formula complicates management of congenital hypothyroidism. *Arch Dis Child*, 89(1), p. 3.
- Dai, G., Levy, O. & Carrasco, N., 1996. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature*, Band 379, p. 458–460.
- Darrouzet, E. et al., 2014. The sodium/iodide symporter: State of the art of its molecular characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*, January, Volume 1838(1), pp. 244-253.
- De la Vieja, A., Dohan, O., Levy, O. & Carrasco, N., 2000. Molecular Analysis of the Sodium/Iodide Symporter: Impact on Thyroid and Extrathyroid Pathophysiology. *Physiological Reviews*, 80(3), pp. 1083-1105.
- De la Vieja, A., Reed, M. D., Ginter, C. S. & Carrasco, N., 2007. Amino acid residues in transmembrane segment IX of the Na⁺/I⁻ symporter play a role in its Na⁺ dependence and are critical for transport activity. *J Biol Chem*.
- Di, C. et al., 2018. Function, clinical application, and strategies of Pre-mRNA splicing in cancer. *Cell Death & Differentiation*, 11.Band 26.
- Dohan, O. et al., 2003. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocrine Reviews*, Band 24, p. 48–77.
- Eskandari, S. et al., 1997. Thyroid Na⁺/I⁻ symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J. Biol. Chem.*, Band 272, p. 27230–27238.
- Faham, S., Watanabe, A., Besserer, G. M. & al, e., 2008. The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport. *Science*, Band 321, pp. 810-814.
- Ferig, M., 2011. *RNA Splicing*. [Online] Available at: https://en.wikipedia.org/wiki/RNA_splicing#cite_note-5 [Zugriff am 22 März 2022].

- Fernández, L. P., López-Márquez, A. & Santisteban, P., 2014. *Nature*. [Online] Available at: <https://www.nature.com/articles/nrendo.2014.186> [Zugriff Juni 2016].
- Ferrandino, G. et al., 2017. An extremely high dietary iodide supply forestalls severe hypothyroidism in Na⁺/I⁻ symporter (NIS) knockout mice.
- Fujiwara, H. et al., 1997. *Nature Genetics*, Band 16, pp. 124-125.
- Geysels, R. C. et al., 2022. Silent but Not Harmless: A Synonymous SLC5A5 Gene Variant Leading to Dyshormonogenic Congenital Hypothyroidism. *Frontiers in Endocrinologz*, Band 13.
- Hall, J. E. & Hall, M. E., 2020. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. 14th Edition Hrsg. Philadelphia: Elsevier.
- Harden, R. M., Alexander, W. D., Chisholm, C. S. & Shimmins, J., 1968. The salivary iodide trap in nontoxic goiter. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Band 28, pp. 117-120.
- Hinghofer-Szalkay, H., 2021. *Physiologie*. [Online] Available at: <http://physiologie.cc/XII.6.htm> [Zugriff am 23 Juni 2022].
- Jhiang, S. M. et al., 1998. An immunohistochemical study of Na⁺/I⁻ symporter in human thyroid tissues and salivary gland tissues. *Endocrinology*, Band 139, p. 4416–4419.
- Köhrle, J. & Brabant, G., 2010. Synthese, Stoffwechsel und Diagnostik der Schilddrüsenhormone. *Internist* 2010; 5: 559-567. *Internist*, Band 5, pp. 559-567.
- Kahaly, G. J. et al., 2007. *Deutsches Ärzteblatt*. [Online] Available at: <https://www.aerzteblatt.de/pdf.asp?id=58371> [Zugriff am 31 August 2020].
- Kinniburgh, A. J. & Martin, T. E., 1976. Detection of mRNA sequences in nuclear 30S ribonucleoprotein subcomplexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(8), p. 2725–2729.
- Kornblihtt, A. e. a., 2013. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 14(3), pp. 153-65.
- Krude, H., 2010. *S2k Leitlinie Primäre angeborene Hypothyreose*. [Online] Available at: https://dgpp.de/cms/media/download_gallery/S2k-Leitlinie_Primaere_angeborene_Hypothyreose.pdf [Zugriff am 20 Mai 2022].
- Kwak, M. J., 2018. Clinical genetics of defects in thyroid hormone synthesis. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.*, Dezember, 23(4), pp. 169-175.
- Lüllmann-Rauch, R., 2003. *Histologie*. 1. Auflage Hrsg. Stuttgart: Thieme.
- La Perle, K. M. et al., 2013. Modulation of Sodium/Iodide Symporter Expression in the Salivary Gland. *Thyroid*, 13 August.23(8).
- Lacroix, L., Mian, C., Caillou, B. & al., e., 2001. Na⁺/I⁻ symporter and Pendred syndrome gene and protein expressions in human extra-thyroidal tissues. *Eur J Endocrinol.*, Band 144, p. 297– 302.
- Levy, O. et al., 1997. Characterization of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter with an anti-COOH terminus antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Band 94, p. 5568–5573.
- Levy, O. et al., 1998. Identification of a structural requirement for thyroid Na⁺/I⁻ symporter (NIS) function from analysis of a mutation that causes human congenital hypothyroidism. *FEBS Lett*, Band 429, p. 36–40.
- Lewis, B. P., Green, R. E. & Brenner, S. E., 2003. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Band 100, pp. 189-192.

- Lindner, M., Bettendorf, M. & Hoffmann, G. F., 2006. *Fachinformation Neugeborenencreening*. [Online] Available at: https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/fileadmin/medienzentrum/Vorlagen/downloads/Arbeitsproben/060125K_IN_BR_SF_NeugeborenencreeningWeb.pdf [Zugriff am 20 Mai 2022].
- López-Bigas, N. et al., 2005. Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary diseases?. *FEBS Lett*, 579(9), pp. 1900-3.
- Martin, M. et al., 2019. Novel Sodium/Iodide Symporter Compound Heterozygous Pathogenic Variants Causing Dys hormonogenic Congenital Hypothyroidism. *Thyroid*, 29(7).
- Martin, M. & Nicola, J. P., 2016. Congenital Iodide Transport Defect: Recent Advances and Future Perspectives. *J Clin Mol Endocrinolo*, Band 1.
- Mitchell, M. L. & Klein, R. Z., 2004. The sequelae of untreated maternal hypothyroidism. *Eur J Endocrinol*, 151(3), p. U45–U48..
- Morreale de Escobar, G., Obregon, M. J. & Escobar del Rey, F., 2004. Role of thyroid hormone during early brain development. *Eur J Endocrinol.*, Band 151, p. U25–U37.
- Mortlock, D., 2014. *Stringfixer Downloads*. [Online] Available at: <https://stringfixer.com/tags/crispr> [Zugriff am 12 Juni 2022].
- Opazo, M. C., Gianini, A., Pancetti, F. & al., e., 2008. Maternal hypothyroxinemia impairs spatial learning and synaptic nature and function in the offspring. *Endocrinology*, Band 149, p. 5097–5106.
- Pan, Q. et al., 2008. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature Genetics*, 40(12), p. 1413–15.
- Paroder-Belenitsky, M., Maestas, M. J., Dohán, O. & al., e., 2011. Mechanism of anion selectivity and stoichiometry of the Na⁺/I⁻ symporter (NIS). *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Band 108.
- Patel, A. A. & Steitz, J. A., 2003. Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, December, 4(12), p. 960–70.
- Pohlenz, J. et al., 1997. Hypothyroidism in a Brazilian Kindred Due to Iodide Trapping Defect Caused by a Homozygous Mutation in the Sodium/Iodide Symporter Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Band 240, pp. 488-491.
- Pohlenz, J. et al., 1998. Congenital hypothyroidism due to mutations in the sodium/iodide symporter. Identification of a nonsense mutation producing a downstream cryptic 3' splice site. *J. Clin. Invest.*, Band 101, p. 1028–1035.
- Portulano, C., Paroder-Belenitsky, M. & Carrasco, N., 2014. The Na⁺/I⁻ Symporter (NIS): Mechanism and Medical Impact. *Endocrine Reviews*, Band 35(1), p. 106–149.
- Promega, 2005. *Technical Manual pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems*, Madison: Promega.
- Ressler, S. et al., 2009. Molecular basis of transport and regulation in the Na⁺/betaine symporter BetP. *Nature*, Band 458, pp. 47-52.
- Reyna-Neyra, A. et al., 2021. The Iodide Transport Defect-Causing Y348D Mutation in de Na⁺/I⁻ Symporter Renders the Protein Intrinsically Inactive and Impairs Its Targeting to the Plasma Membrane. *Thyroid*, 31(8), pp. 1272-1281.

- Rodriguez, A. M., Perron, B., Lacroix, L. & al., e., 2002. Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab*, Band 87, p. 3500–3503.
- Roepke, T. K., King, E. C., Reyna-Neyra, A. & al., e., 2009. Kcne2 deletion uncovers its crucial role in thyroid hormone biosynthesis. *Nat Med.*, Band 15, p. 1186–1194.
- Singh, G. & Cooper, T. A., 2006. Minigene reporter for identification and analysis of cis elements and trans factors affecting pre-mRNA splicing. *BioTechniques*, August, Band 41, pp. 177-181.
- Smanik, P. A. et al., 1996. Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Band 226, p. 339–345.
- Spinas, G. A. et al., 2011. *Endokrinologie und Stoffwechsel kompakt, 2. Auflage*. Stuttgart: Thieme Verlag.
- Spinas, G. A., Fischli, S., Streuli, R. & Lüthi, N., 2015. *Megru*. [Online] Available at: <https://megru.ch/endokrinologiev2/Schilddruese.php> [Zugriff am 23 06 2019].
- Spitzweg, C. & Morris, J. C., 2002. Sodium Iodide Symporter (NIS) and Thyroid. *Hormones*, Band 1, pp. 22-34.
- Stoupa, A. et al., 2021. High Diagnostic Yield of Targeted Next-Generation Sequencing in a Cohort of Patients With Congenital Hypothyroidism Due to Dysmorphogenesis. *Frontiers in Endocrinology*, Band 11.
- Stoupa, A. et al., 2020. First case of fetal goitrous hypothyroidism due to SLC5A5/NIS mutations. *European Journal of Endocrinology*, 183(5), pp. K1-K5.
- Stoupa, A., Kariyawasam, D., Polak, M. & Carre, A., 2022. Genetics of congenital hypothyroidism: Modern concepts. *Pediatr Investig*, Band 00, pp. 1-12.
- Sun, X., Ali, M. S. S. H. & Moran, M., 2017. The role of interactions of long non-coding RNAs and heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in regulating cellular functions.. *Biochemical Journal*, 474(17), p. 2925–2935.
- Szinnai, G., Lacroix, L., Carre, A. & et al., 2007. Sodium/iodide symporter (NIS) gene expression is the limiting step for the onset of thyroid function in the human fetus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Band 92, p. 70–76.
- Taggart, A. J. et al., 2012. Large-scale mapping of branchpoints in human pre-mRNA transcripts in vivo. *Nature Structural & Molecular Biology*, Juni, 19(7), p. 719–21.
- Tanase-Nakao, K. et al., 2018. Fetal Goitrous Hypothyroidism and Polyhydramnios in a Patient with Compound Heterozygous DUOXA2 Mutations. *Horm Res Paediatr*, Band 90, pp. 132-137.
- Tazebay, U. H. et al., 2000. The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nat Med*, Band 6, p. 871–878.
- Toyoshima, K., Matsumoto, Y., Nishida, M. & Yabuuchi, H., 1977. Five cases of absence of iodide concentrating mechanism. *Acta Endocrinol (Copenh)*, Band 84, pp. 527-537.
- Van Sande, J. et al., 2003. Anion selectivity by the sodium iodide symporter. *Endocrinology*, Band 144, p. 247–252.
- Wahl, M. C., Will, C. L. & Luhrmann, R., 2009. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*, 136(4), pp. 701-18.
- Walter, M., 2017. *Nonsense-mediated-decay*. [Online] Available at: https://en.wikipedia.org/wiki/Nonsense-mediated_decay#/media/File:NMD_-_Nonsense-mediated_decay.png [Zugriff am 23 Juni 2022].
- Wassner, A. J., 2018. Congenital hypothyroidism. *Clinics in perinatology*, Band 45, pp. 1-18.

- Will, C. L. & Luhrmann, R., 2011. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(7).
- Wolff, J., 1983. Congenital Goiter with Defective Iodide Transport. *Endocrine Reviews* 4, 240–254 (1983). *Endocrine Reviews*, Band 4, pp. 240-254.
- Wright, E. M. & Turk, E., 2004. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.*, Band 447, pp. 510-518.
- Zapanta, P. E. & Shokri, T., 2019. *Medscape*. [Online] Available at: <https://emedicine.medscape.com/article/845125-overview> [Zugriff am 19 Juni 2019].
- Zhang, C.-X. et al., 2021. Novel Compound Heterozygous Pathogenic Mutations of SLC5A5 in a Chinese Patient With Congenital Hypothyroidism. *Frontiers in Endocrinology*, Band 12.
- Zhao, Y., Dunker, W., Yu, Y.-T. & Karijolich, J., 2018. The Role of Noncoding RNA Pseudouridylation in Nuclear Gene Expression Events. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Band 6.

Danksagung

Meiner Familie für die Unterstützung während der Laborzeit und der Schreibzeit.

Meinem Mann, der mich immer wieder motiviert hat und auf einiges meiner Zeit verzichtet hat, damit ich schreiben konnte und sich in der letzten Zeit so liebevoll um unsere Kleine gekümmert hat. Und natürlich auch für die Bearbeitung und Anpassung meiner Abbildungen.

Meinem kleinen Schatz Joanna Catalina, die mich leider in den ersten Monaten ihres Lebens immer wieder an den Computer abtreten musste, dies aber mit Papas und auch Omas tatkräftiger Hilfe sehr gut überstanden hat.

Meine Mutter für die unermüdliche Motivation, welche mir geholfen hat meine Schreibblockaden zu überwinden und am Ende auch fürs Babysitten, wann immer es ihr möglich war.

Meinen Schwiegereltern für die Unterstützung nach der Geburt unserer Kleinen.

Meiner geistlichen Familie für die unermüdlichen Gebete insbesondere während schwieriger Phasen des Schreibens. Danke dass ihr alle nicht aufgegeben habt!!!

An Philip Wilkin für die Etablierung der nötigen PCR-Methoden.

An Carina Klutmann für die Hilfe bei den PCRs der cDNA.

An Farah Izadpanah für die liebevolle Unterstützung und Hilfe bei der DNA Isolation aus dem Blut.

An alle weiteren Mitarbeiter des Labors für die Gemeinschaft und Unterstützung.

An Dr. Pia Hermanns, für die exzellente Betreuung und Unterstützung und die notwendige Geduld bei den rezidivierenden Korrekturen, ohne diese Hilfe hätte ich es nicht geschafft.

An Univ.-Prof. Dr. Joachim Pohlenz für die Möglichkeit der Dissertation, die notwendige Geduld und die zügige Korrektur.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Sandra Gessner
Geburtsdatum: 18. Dezember 1990
Geburtsort: Mosbach

Bildung und Beruflicher Werdegang

| | |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Seit 09/2021 | Mutterschutz und Elternzeit |
| 01 – 09/2021 | Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik Karl Leisner Kliniken, Kalkar |
| 07 – 12/2020 | Klinik für Kinder und Jugendmedizin, Neonatologie, Karl Leisner Kliniken, Kleve |
| 01 – 06/2020 | Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie, Karl Leisner Kliniken, Goch |
| 06/2018 – 12/2019 | Innere Medizin Karl Leisner Kliniken Goch mit Rotationen in die Hämatologie, Internistische Onkologie, Palliativmedizin, Pneumologie, Allergologie, Schlaf- und Beatmungsmedizin, Umweltmedizin, Gastroenterologie, Intensivmedizin |
| Seit 06/2018 | Weiterbildung zum Facharzt für Allgemeinmedizin |
| Approbation | 24.05.2018 |
| 3. Staatsexamen | 16.05.2018 (Note: gut – Gesamtnote: gut (2,33)) |
| 01 – 04/2018 | 3. PJ Terial Innere Medizin Karl Leisner Kliniken Kleve/Goch/Kevelaer (Allgemeine Innere, Diabetologie, Gastroenterologie, Onkologie, Kardiologie, Pneumologie) |
| 08 – 12/2017 | 2. PJ Terial Chirurgie, Karl Leisner Kliniken Kleve/Goch/Kevelaer (Unfallchirurgie, Allgemeine Chirurgie, Viszeral- und spezielle Viszeralchirurgie, Thoraxchirurgie, Gefäßchirurgie, 2 Wochen Anästhesie) |
| 04 – 08/2017 | 1. PJ Terial Pädiatrie, Gemeinschaftsklinikum Mittelrhein, Koblenz (Notaufnahme, Station, Onkologie, Intensiv- station, NICU) |
| 2. Staatsexamen | 06.04.2017 (Note: gut) |

| | |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 09 – 10/2016 | 3-wöchige Famulatur in der Kinderarztpraxis Fr. Herberg, Mosbach (Sprechstunde, Vorsorgeuntersuchungen, ADHS-Programm) |
| 08 – 09/2016 | Famulatur in der Hausarztpraxis MEDICI, Wiesbaden (Sprechstunde, Sonographie, Ergometrie, Vorsorge) |
| 09/2015 | Famulatur in der Gynäkologie, Krankenhaus Havelhöhe, Berlin (Station, OP-Assistenz, Kreißsaal, Wochenbett und Ambulanz) |
| 03 – 04/2015 | Famulatur in der Gynäkologie und Pädiatrie, Yenepoya University, Mangalore, Indien (Ambulanz, Station, Gyn-OP und Kreißsaal, Assistenz bei Geburten, Untersuchung der Säuglinge und Kinder, Dorfcamps, Außenstationen) |
| 02 – 03/2014 | Famulatur in der Chirurgie, DRK Krankenhaus Alzey (Notaufnahme, Ambulanz, Station, OP-Assistenz) |
| Physikum | 29.08.2013 (Note: befriedigend) |
| 08 – 09/2012 | Krankenpflegepraktikum auf der HTG-Chirurgie, Uniklinik Mainz |
| 03 – 04/2012 | Krankenpflegepraktikum auf der Viszeral- und Unfallchirurgie u. Orthopädie, St. Joseph Krankenhaus Hermeskeil |
| 10/2011 – 05/2018 | Studium der Humanmedizin an der JGU Mainz |
| 09/2011 | 14-tägiges Kinderkrankenpflegepraktikum in der Neurologischen Pädiatrie, Uniklinik Mannheim |
| 08/2010 – 08/2011 | Freiwilliges Soziales Jahr, Universidad Adventista de Centroamerica, Alajuela, Costa Rica (Englisch- und Französischunterricht im Sprachzentrum und Vor- und Grundschule, Alphabetisierungsprogramme in der Stadt, Mithilfe bei sozialen Projekten) |
| 09/2001 – 06/2010 | Nicolaus-Kistner-Gymnasium in Mosbach, BW Schulabschluss: Abitur (1,2) |
| 09/1997 – 07/2001 | GHWRS Billigheim |
| <u>Nebentätigkeiten</u> | |
| Seit 10/2015 | ehrenamtliche Mithilfe bei Brücke zum Leben e.V. (02 – 03/2016 Auslandseinsatz in Ruanda u. Uganda, |

| | |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | Mithilfe bei Projektbetreuungen, Patenkindern, Gesundheitsberatung, Familienplanung) |
| 03/2014 – 04/2017 | Studentische Hilfskraft im GIZ (Giftinformationszentrum) Mainz (v.a. Mithilfe bei der Telefonberatung, Follow-Up-Eingabe und Pflege der Datenbank) |
| 10/2013 - 2015 | ehrenamtliche Mithilfe beim e. V. Medinetz Mainz (Vermittlung von Arztterminen für Personen ohne Krankenversicherung, Ansprechpartner, teilweise weitere Betreuung und soziale Hilfestellungen) |
| 09/2013 - 2014 | Studentische Aushilfe in der Gemeinschaftspraxis für Radiologie und Nuklearmedizin – Malakoff – Mainz (unregelmäßig, fahren diverser MRTs (HWS, BWS, Knie, OSG, Schulter) |
| Sprachkenntnisse: | Englisch, Französisch, Holländisch, Spanisch, Portugiesisch |
| Freizeitaktivitäten: | Lesen, Reiten, Reisen, Gesundheits-, Kinder- und Jugendarbeit in der Gemeinde sowie Mithilfe bei der Organisation von Freizeiten, Chor |