

Aus der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Untersuchung des *SLC26A7*- Gens auf ursächliche Mutationen bei kongenitaler  
Hypothyreose**

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

Vorgelegt von

Charlotte Claßen  
aus Neunkirchen, Saar

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand:

[REDACTED]

1. Gutachter:

[REDACTED]

2. Gutachter:

[REDACTED]

Tag der Promotion:

15.10.2024

## Vorbemerkung

Teile der folgenden Arbeit wurden bereits im Medizinjournal Thyroid veröffentlicht:

Hermanns, P., **C. Classen**, and J. Pohlenz, ***A Novel Homozygous Mutation in the Solute Carrier Family 26 Member 7 Gene Causes Thyroid Dyshormonogenesis in a Girl with Congenital Hypothyroidism.*** Thyroid, 2020. **30**(12): p. 1831-1833.

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis .....	VI
Abbildungsverzeichnis .....	VII
1 Einleitung / Ziel der Dissertation.....	1
1.1 Wissenschaftlicher Hintergrund.....	1
1.2 Ziel der Dissertation .....	2
2 Literaturdiskussion.....	4
2.1 Die Schilddrüse .....	4
2.1.1 Anatomie und Histologie der Schilddrüse .....	4
2.1.2 Funktion der Schilddrüse .....	5
2.1.3 Schilddrüsenhormonbiosynthese .....	7
2.1.4 Hormonregelkreis.....	9
2.2 Kongenitale Hypothyreose .....	10
2.2.1 Epidemiologie.....	10
2.2.2 Klinisches Erkrankungsbild und Ätiologie .....	10
2.2.3 Diagnostik und Therapie .....	12
2.2.4 Genetische Ursachen.....	17
2.3 <i>SLC26A7</i> -Gen .....	22
2.3.1 <i>SLC26</i> Genfamilie .....	22
2.3.2 Struktur und Funktion von <i>SLC26A7</i> .....	24
2.4 Die Rolle von <i>SLC26A7</i> bei kongenitaler Hypothyreose .....	28
2.4.1 <i>SLC26A7</i> in der Schilddrüse .....	28
2.4.2 Beschriebene Mutationen in <i>SLC26A7</i> bei Patienten .....	30
3 Material und Methoden.....	31
3.1 Material.....	31
3.1.1 Verbrauchsmaterialien .....	31

3.1.2	Geräte .....	31
3.1.3	Reagenzien .....	33
3.1.4	Puffer und Lösungen.....	34
3.1.5	Primer.....	35
3.1.6	Patienten .....	36
3.2	Methoden .....	39
3.2.1	Auswahl der Patienten .....	39
3.2.2	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i> .....	41
3.2.3	Agarosegelelektrophorese .....	41
3.2.4	<i>Exonuclease-Phosphatase-Verdau</i> .....	41
3.2.5	Sequenzierungsreaktion nach Sanger .....	42
3.2.6	Fällung der Sequenzreaktion und elektrophoretische Auftrennung .....	42
3.2.7	Auswertung der Sequenzen.....	42
3.2.8	<i>in silico</i> -Analysen .....	43
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Patientenkollektiv .....	45
4.1.1	Auswahlkriterien.....	45
4.2	Etablierung der Methoden .....	45
4.2.1	Generieren der Primersequenzen.....	45
4.2.2	Etablierung der PCR-Bedingungen.....	46
4.2.3	Etablierung der Sequenzierung.....	50
4.3	Auswertung der Sequenzen .....	52
4.3.1	Polymorphismen in <i>SLC26A7</i> .....	52
4.3.2	Mutationen in <i>SLC26A7</i> .....	55
4.3.3	Noch nicht beschriebene Veränderungen in <i>SLC26A7</i> .....	58
4.3.4	Zusammenfassung.....	61
5	Diskussion .....	63
5.1	Auswahlkriterien der Kandidaten und Patientenkollektiv.....	63

5.2	Sequenzen und Datenbanken.....	64
5.2.1	Sequenzen.....	64
5.2.2	Datenbanken.....	65
5.3	Polymorphismen in <i>SLC26A7</i> .....	65
5.4	Mutation in <i>SLC26A7</i> .....	66
5.4.1	c.1432_1433delGT, p.V478KfsX11.....	67
5.5	Noch nicht beschriebene Veränderungen in <i>SLC26A7</i> .....	75
5.5.1	c.796-123 C>A.....	75
5.5.2	c.1935+176 del T.....	79
5.5.3	c.1259_1267dupTGCTAATAC, p.Q423LinsLIQ.....	83
5.6	Ursächliche Mutationen im <i>SLC26A7</i> -Gen bei CH.....	90
5.7	Ausblick.....	92
5.7.1	Untersuchungen des Spleißverhaltens.....	92
5.7.2	Aufnahme von <i>SLC26A7</i> in die Routinediagnostik.....	93
6	Zusammenfassung.....	95
	Literaturverzeichnis.....	97
	Anhang.....	108
	Danksagung.....	112
	Lebenslauf.....	113

## Abkürzungsverzeichnis

CH	Kongenitale Hypothyreose
WES	Whole Exome Sequencing
SLC26A7	Solute carrier family 26 member 7
PCR	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>
TG	Thyreoglobulin
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
TR	nukleärer Schilddrüsenhormonrezeptor
NIS/ SLC5A5	Na <sup>+</sup> /I <sup>-</sup> Symporter
PDS/ SLC26A4	Pendrin
TPO	Thyreoperoxidase
MIT	Monoiodtyrosin
DIT	Diiodtyrosin
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
IYD/ DEHAL1	Iodotyrosin-Dehalogenase
DUOX2	Dualoxidase 2
DUOXA2	Dualoxidase maturation factor 2
TRH	Thyrotropin-Releasing Hormon
TSH	Thyroid-Stimulating Hormon
tT4	Gesamt T4
ft4	freies T4
ft3	freies T3
SD-Ak	Schilddrüsenantikörper
GIS	Gland in situ
NGS	Next Generation Sequencing
SLC26	Solute linked carrier 26

STAS	Sulfate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist
AS	Aminosäure
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
UTR	untranslatierte Region
bp	Basenpaare
HGVS	Human Genome Variation Society
A	Adenin
T	Thymin
C	Cytosin
G	Guanin
MAF	Minor Allele Frequency
VUS	Variants of unknown significance
WT	Wildtyp
SNP	single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismen)

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TSH-, T3- und T4-Werte bei primärer, sekundärer und tertiärer Hypo- und Hyperthyreose.....	9
Tabelle 2: Die verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Namen- und Herstellerangaben.....	31
Tabelle 3: Die verwendeten Geräte mit Namen- und Herstellerangaben .....	33
Tabelle 4: Die verwendeten Reagenzien mit Namen- und Herstellerangaben .....	34
Tabelle 5: Die verwendeten Puffer und Lösungen und ihre Reagenzien.....	35
Tabelle 6: Die verwendeten Primersequenzen für <i>SLC26A7</i> .....	36
Tabelle 7: Ergebnisse der genetischen Voruntersuchungen der ausgewählten Patienten in den Kandidatengenen für CH.....	37
Tabelle 8: Die klinischen Merkmale Geschlecht, Struma, TSH-Wert und TG-Wert der ausgewählten Patienten.....	38
Tabelle 9: PCR-und Sequenzierprotokoll für <i>SLC26A7</i> .....	47
Tabelle 10: Gesamtübersicht der gefundenen <i>SLC26A7</i> - Polymorphismen bei den untersuchten Patienten .....	54
Tabelle 11: Gesamtübersicht der gefundenen <i>SLC26A7</i> - Mutationen bei den untersuchten Patienten .....	55
Tabelle 12: Gesamtübersicht der noch nicht beschriebenen Veränderungen in <i>SLC26A7</i> bei den untersuchten Patienten .....	58
Tabelle 13: Vergleich der chemischen Eigenschaften der Aminosäuren 423-426 des <i>SLC26A7</i> Wildtyp mit der Variante <i>SLC26A7</i> p.L483P .....	89
Tabelle 14: Übersicht der <i>SLC26</i> -Gene mit Ausnahme von <i>SLC26A7</i> .....	111

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Proteinstruktur von SLC26A7 .....	1
Abbildung 2:	Anatomie der Schilddrüse .....	4
Abbildung 3:	Schilddrüsenhormonbiosynthese .....	8
Abbildung 4:	Diagnostikschema der angeborenen Hypothyreose .....	15
Abbildung 5:	Strukturmodell der SLC26-Proteine .....	23
Abbildung 6:	SLC26A7 RNA-Expression in humanem Gewebe .....	25
Abbildung 7:	Schema zur Patientenauswahl .....	40
Abbildung 8:	1. Etablierungsschritt .....	49
Abbildung 9:	2. Etablierungsschritt .....	50
Abbildung 10:	3. Etablierungsschritt .....	50
Abbildung 11:	Elektropherogramm von SLC26A7 Exon 3 mit Forward- und Reverse-Sequenzierprimer .....	51
Abbildung 12:	Sequenz von SLC26A7 Exon 14 .....	56
Abbildung 13:	(A) Stammbaum der Familie von Patient 3 und (B) Sequenzierung des Exon 14 von SLC26A7 der Familienmitglieder .....	57
Abbildung 14:	Sequenz von SLC26A7 Intron 7 .....	59
Abbildung 15:	Sequenz von SLC26A7 Exon 12. ....	59
Abbildung 16:	(A) Stammbaum der Familie von Patient 19 und (B) Sequenzierung des Exon 12 von SLC26A7 der Familienmitglieder .....	60
Abbildung 17:	Sequenz von SLC26A7 Intron 19 .....	61
Abbildung 18:	ALFA Allele Frequency für den Polymorphismus c.194-155 G>A ....	66
Abbildung 19:	<i>Ensembl</i> -Darstellung: Protein Domänen für SLC26A7, ENST00000523719.5 .....	68
Abbildung 20:	<i>Phobius</i> - Analyse: Analyse der Transmembrandomänen und Signalpeptide von SLC26A7 Wildtyp und p.V478KfsX11 .....	68
Abbildung 21:	<i>Mutation Taster</i> Vorhersage zu c.1432_1433delGT, p.V478KfsX11	69
Abbildung 22:	<i>ESEfinder</i> -Analyse der Splice Sites: Vergleich SLC26A7 Wildtyp mit c.1432_1433del GT .....	70
Abbildung 23:	<i>ESEfinder</i> -Analyse der Bindungsstellen von SRProteinen: Vergleich SLC26A7 Wildtyp mit c.1432_1433del GT .....	70
Abbildung 24:	<i>SpliceAID</i> -Analyse: Vergleich SLC26A7 Wildtyp mit c.1432_1433del GT .....	71
Abbildung 25:	<i>SWISS-MODEL</i> : Vergleich SLC26A7 Wildtyp mit p.V478KfsX11 ....	72

Abbildung 26: <i>STRING</i> Analyse über die Protein-Protein Interaktionen von SLC26A7	74
Abbildung 27: <i>Mutation Taster</i> Vorhersage zu c.796-123	76
Abbildung 28: <i>ESEfinder</i> -Analyse der Splice Sites: Vergleich SLC26A7 Wildtyp mit c.796-123 C>A	77
Abbildung 29: <i>ESEfinder</i> -Analyse der Bindungsstellen von SRProteinen: Vergleich SLC26A7 Wildtyp mit c.796-123 C>A	78
Abbildung 30: <i>SpliceAID</i> -Analyse: Vergleich SLC26A7 Wildtyp mit c. 796-123 C>A	78
Abbildung 31: <i>Mutation Taster</i> Vorhersage zu c.1935+176 del T	80
Abbildung 32: <i>ESEfinder</i> -Analyse der Splice Sites: Vergleich SLC26A7 Wildtyp mit c.1935+176 del T	81
Abbildung 33: <i>ESEfinder</i> -Analyse der Bindungsstellen von SRProteinen: Vergleich SLC26A7 Wildtyp mit c.1935+176 del T	81
Abbildung 34: <i>SpliceAID</i> -Analyse: Vergleich SLC26A7 Wildtyp mit c.1935+176 del T	82
Abbildung 35: <i>Ensembl</i> -Darstellung: Protein Domänen für SLC26A7, ENST00000523719.5 und Position der Duplikation c.1259_1267dupTGCTAATAC, p.Q423LinsLIQ	83
Abbildung 36: <i>Phobius</i> - Analyse: Analyse der Transmembrandomänen und Signalpeptide von SLC26A7 Wildtyp und p.Q423LinsLIQ	84
Abbildung 37: <i>Mutation Taster</i> Vorhersage zu c.1259_1267dupTGCTAATAC	85
Abbildung 38: <i>Polyphen</i> -Analyse zu p.Q423L, p.F424L, p.R425I, p.D426Q	86
Abbildung 39: <i>ESEfinder</i> -Analyse der Splice Sites: Vergleich SLC26A7 Wildtyp mit c.1259_1267dupTGCTAATAC	87
Abbildung 40: <i>ESEfinder</i> -Analyse der Bindungsstellen von SRProteinen: Vergleich SLC26A7 Wildtyp mit c.1259_1267dupTGCTAATAC	87
Abbildung 41: <i>SpliceAID</i> -Analyse: Vergleich SLC26A7 Wildtyp mit c.1259_1267dupTGCTAATAC	88
Abbildung 42: <i>SWISS-MODEL</i> : Vergleich SLC26A7 Wildtyp mit p.Q423LinsLIQ	89
Abbildung 43: Bisher publizierte SLC26A7- Mutationen von Patienten mit CH mit der neu gefundenen Mutation p.V478KfsX11 und der VUS p.Q423LinsLIQ am SLC26A7-Proteinmodell	92

# 1 Einleitung / Ziel der Dissertation

## 1.1 Wissenschaftlicher Hintergrund

Die angeborene Hypothyreose (CH) ist die häufigste angeborene Endokrinopathie [1]. Ein Mangel an Schilddrüsenhormonen kann einen negativen Einfluss auf die neuronale und körperliche Entwicklung des Kindes haben, die durch eine frühzeitige adäquate Therapie mit L-Thyroxin vermeidbar sind [1, 2]. Bei Geburt ist das klinische Bild jedoch meist unauffällig oder unspezifisch. Im Rahmen des Neugeborenenenscreening werden alle Neugeborenen auf CH untersucht [3]. Ursächlich für die CH sind zum einen Anlagestörungen, bei denen die Schilddrüse entweder nicht vorhanden (Aplasie), zu klein (Hypoplasie) oder nicht in der richtigen Lage (Ektopie) angelegt ist, zum anderen Schilddrüsenhormonbiosynthesestörungen mit normal angelegter oder vergrößerter Schilddrüse [4]. Die Anlagestörung ist die häufigere Ursache der CH. Allerdings zeigen neuere Studien, dass der Anteil der Patienten mit normal angelegter oder vergrößerter Schilddrüse größer ist als bislang geglaubt [4-6]. Anders als bei Anlagestörungen wird bei diesen Patienten nicht immer eine molekulargenetische Ursache für die CH in der Routinediagnostik gefunden [7]. Das lässt neben den bereits bekannten Kandidatengenen *SLC5A5*, *SLC26A4*, *TG*, *TPO*, *DUOX2*, *DUOXA2* und *IYD* weitere ursächliche Gene für Schilddrüsenhormonbiosynthesestörungen vermuten, nach denen z.B. mit Hilfe von Whole Exome Sequencing (WES) gesucht wird [7-9].

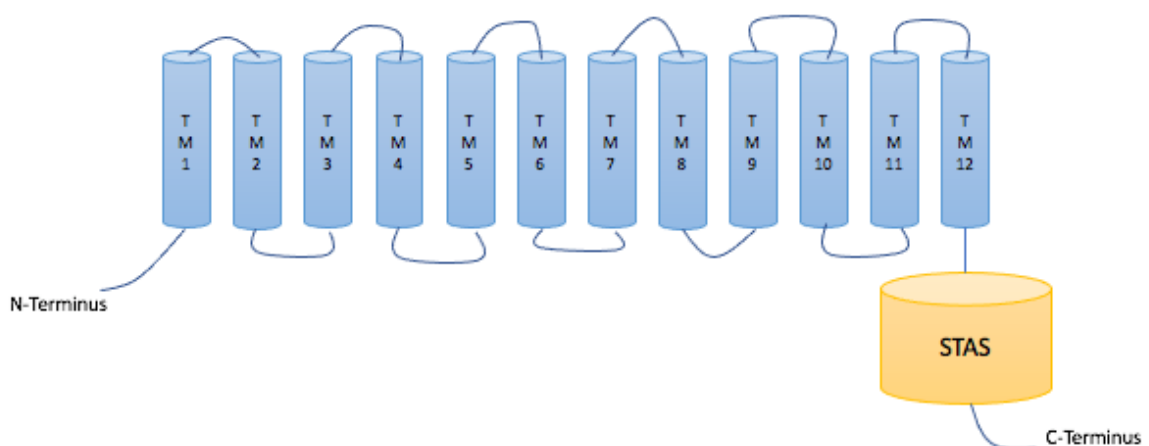


Abbildung 1: Proteinstruktur von SLC26A7: SLC26A7 besteht aus einer N-terminalen zytoplasmatischen Region, gefolgt von Transmembrandomänen und einem zytoplasmatischen C-terminalen Ende. Am C-Terminus befindet sich die STAS-Region, die für Proteine der SLC26- Genfamilie charakteristisch ist. TM= Transmembrandomäne, STAS= Sulfate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist; modifiziert nach Ishii et al. [10]

*Solute carrier family 26 member 7 (SLC26A7)* wurde 2018 erstmals im Zusammenhang mit CH beschrieben [9]. Durch WES wurden Mutationen im *SLC26A7*-Gen bei CH-Patienten detektiert und als krankheitsverursachend beschrieben [9, 11]. *SLC26A7* gehört zur *SLC26*-Genfamilie, die für Anionenkanäle kodieren und ähnliche Proteinstrukturen aufweisen [12] (siehe Abbildung 1). Ein bereits bekanntes Kandidatengen dieser Familie ist *SLC26A4 (Pendrin)*, das, wenn mutiert, Schwerhörigkeit, Hypothyreose und die Bildung einer Struma verursacht [13]. Interessanterweise bleibt bei *Slc26a4*-Knockout-Mäusen eine Schilddrüsen Manifestation aus, was vermuten lässt, dass neben *Slc26a4* noch weitere Iodid-Transporter existieren [12, 14].

Untersuchungen zu *SLC26A7* haben gezeigt, dass *SLC26A7* sowohl eine Funktion als Anionenaustauscher als auch als reiner Anionenkanal inne hat [12]. In Knockout-Maus-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust von *Slc26a7* zu einem gestörten Säure-Base-Haushalt führt [15]. In Nieren von *Slc26a7<sup>-/-</sup>* Mäusen kommt es zu einer renalen tubulären Azidose und im Magen zur veränderten Säuresekretion [15]. Außerdem entwickeln diese Mäuse eine hypothyreote Struma, sowie hyperplastische Schilddrüsenfollikel [11]. Die genaue Funktion von *SLC26A7* in der Schilddrüse ist wie die Lokalisation noch umstritten. Es wird jedoch eine Funktion als Iodid-Transporter vermutet [10, 11].

## **1.2 Ziel der Dissertation**

Im Rahmen dieser Arbeit soll das *SLC26A7*-Gen auf ursächliche Mutationen bei CH-Patienten untersucht werden.

Dazu sollen anhand der bereits beschriebenen *SLC26A7*-Mutationen geeignete klinische Auswahlkriterien erarbeitet und Patienten, bei denen eine molekulargenetischen Diagnostik von Schilddrüsenenerkrankungen im Labor der AG XXXXXXXXXX, Molekulare Pädiatrische Endokrinologie erfolgt, gezielt auf *SLC26A7*-Mutationen gescreent werden. Neben bereits molekulargenetisch voruntersuchten Patienten, die keine ursächlichen Mutationen in den bisher bekannten Kandidatengen aufweisen, werden zusätzlich Kandidaten prospektiv ausgewählt, um zu untersuchen, ob sich nur anhand des klinischen Phänotyps bei Patienten mit CH *SLC26A7*-Mutationen detektieren lassen.

Zur Untersuchung dieser Kandidaten soll ein geeignetes PCR- und Sequenzierungsprotokoll für *SLC26A7* etabliert werden, das auch in der Routinediagnostik angewendet werden kann. Im Anschluss soll das *SLC26A7*-Gen der ausgewählten

Patienten mittels Sanger-Sequenzierung sequenziert und mit Hilfe von *in silico*-Analysen auf ursächliche Mutationen hin untersucht werden.

Ziel dieser Dissertation ist es Auswahlkriterien für Patienten mit einem hohen Risiko für eine *SLC26A7*-Mutation zu schaffen, entsprechende Laborprotokolle zur Untersuchung von *SLC26A7* zu etablieren und für CH ursächliche Mutationen bei den ausgewählten Patienten in *SLC26A7* zu identifizieren. Auf diese Weise sollen einerseits Erkenntnisse gewonnen werden, die eine Aufnahme von *SLC26A7* als neues Kandidatengen in die Routinediagnostik unterstützen und andererseits durch Identifikation neuer Mutationen Hinweise auf die Rolle von *SLC26A7* bei CH gesammelt werden.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Die Schilddrüse

Die schmetterlingsförmige Schilddrüse ist ein endokrines Organ, das Einfluss auf zahlreiche Stoffwechselwege, Organe, das Knochenwachstum und insbesondere die neuronale Entwicklung hat [16, 17]. Im Folgenden soll näher auf ihre Anatomie, Histologie sowie Physiologie eingegangen werden.

#### 2.1.1 Anatomie und Histologie der Schilddrüse

##### *Anatomie*

Die Schilddrüse besteht aus einem rechten und linken Lappen, die in der Mitte über den Isthmus verbunden sind [18]. Oberhalb des Isthmus zeigt sich bei 50% der Bevölkerung ein weiterer pyramidenförmiger Lappen, der ein Relikt des Ductus thyreoglossus aus der Embryonalentwicklung darstellt [18, 19]. Eine Bindegewebskapsel umhüllt die Schilddrüse [18]. Dorsal an den Seitenlappen befinden sich die Nebenschilddrüsen, die häufig von der Organkapsel mit eingeschlossen werden [18]. Das schmetterlingsförmige Organ liegt der Trachea auf und kann sich mit der Spitze des Lobus pyramidalis bis zum Schildknorpel (Cartilago thyroidea) erstrecken [18] (Abbildung 2).

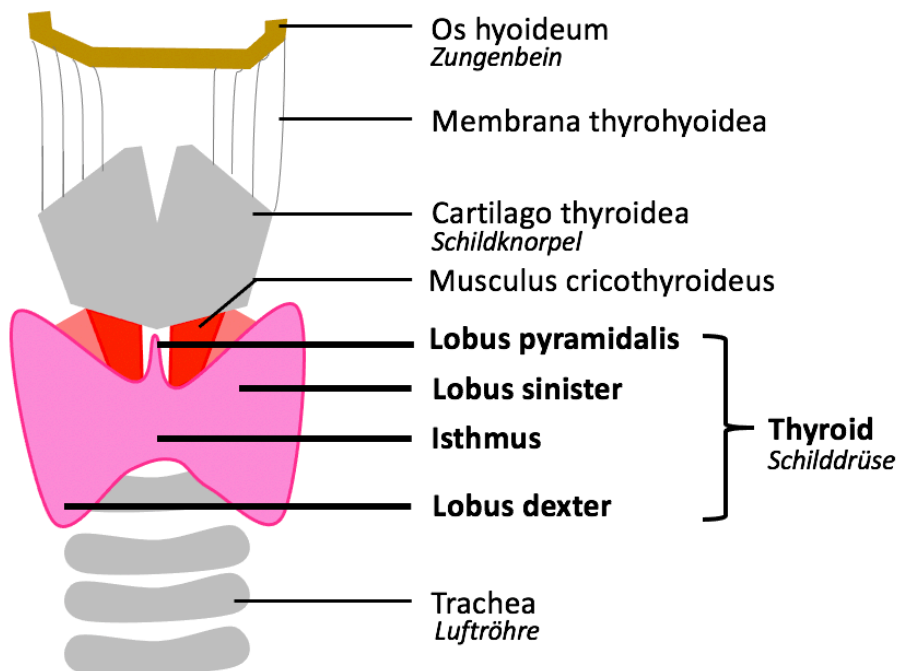


Abbildung 2: Anatomie der Schilddrüse

## *Histologie*

Mikroskopisch betrachtet, bildet die Schilddrüse ein Netz aus Schilddrüsenfollikeln, das durch dünne Bindegewebssepten und Blutgefäße getrennt wird [19]. Die Schilddrüsenfollikel bestehen aus einem einschichtigen Epithel und dem Lumen, das das Kolloid enthält [19]. In den Follikelzellen (Thyreozyten) findet vor allem der Austausch mit dem Blutgefäßsystem statt und es wird die Vorstufe der Schilddrüsenhormone, das Thyreoglobulin (TG), gebildet [16, 19]. Im Follikellumen wird TG zu Trijodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) iodiert und anschließend im Kolloid gespeichert [16, 19]. Basal der Epithelzellen und parafollikulär befinden sich außerdem die C-Zellen, die das für den Calcium- und Phosphatstoffwechsel wichtige Hormon Calcitonin produzieren [19].

### **2.1.2 Funktion der Schilddrüse**

Die Hauptfunktionen der Schilddrüse bestehen in der Synthese, Speicherung und Ausschüttung der Schilddrüsenhormone T3 und T4.

Besonders beim Wachstum und der neuronalen Entwicklung von Kindern spielen diese beiden Hormone eine wichtige Rolle [16, 17, 20]. Durch die direkte Wirkung auf Chondrozyten und Osteoblasten nehmen sie Einfluss auf die intramembranöse und enchondrale Ossifikation, die Knochenreifung, die Mineralisation und das Längenwachstum [20]. Kinder mit einer Schilddrüsenunterfunktion können unter verzögertem Verschluss der Fontanellen, Kleinwuchs mit gestörter Verknöcherung und in schwerwiegenden Fällen unter Fehlbildungen sowie Skelettdeformationen leiden [20, 21]. Außerdem sind Schilddrüsenhormone essenziell für die normale Entwicklung des neuronalen Systems, indem sie die neuronale Proliferation, die neuronale Migration, die Differenzierung von Neuronen und Gliazellen, die Bildung von Myelinscheiden, die synaptische Plastizität sowie Interneurone beeinflussen [17]. Bereits pränatal kann eine maternale Hypothyroxinämie eine verzögerte kognitive Entwicklung der Kinder und ein geringeres Volumen der grauen Substanz hervorrufen, wie eine Kohortenstudie aus den Niederlanden zeigt [22, 23]. Auch im Tiermodell wurde eine Auswirkung der maternalen Hypothyroxinämie auf die Neurogenese der Nachkommen nachgewiesen. Diese Nachkommen wiesen Veränderungen bei der neuronalen Migration während der Neokortikogenese im Hippocampus und im somatosensorischen Kortex auf [24]. Darüber hinaus gehen auch unbehandelte kindliche Schilddrüsendefekte, wie beispielsweise die angeborene Hypothyreose, mit einer verringerten Intelligenz einher [25].

Die Schilddrüsenhormone spielen jedoch nicht nur im Kindesalter eine wichtige Rolle, sondern haben auch bei Erwachsenen Auswirkungen auf nahezu jedes Organ. Eine Hypothyreose kann deshalb die unterschiedlichsten Symptome wie Depression, Unfruchtbarkeit, Menstruationsstörungen, Bradykardie, Hypotonie, Kurzatmigkeit, Hypothermie, Haarverlust, Verschlechterung der Nierenfunktion oder Muskelschwäche hervorrufen [26-32]. Außerdem wirken die Schilddrüsenhormone auf zahlreiche Stoffwechselwege. Sie steigern durch eine vermehrte Genexpression der  $Na^+/K^+ATPase$  den Grundumsatz, stimulieren die Proteinsynthese, greifen in den Fettstoffwechsel ein, indem sie sowohl die Lipolyse als auch die Lipidsynthese verstärken können und haben Einfluss auf den Glucosestoffwechsel [16, 33].

Der Effekt der Schilddrüsenhormone wird durch die Regulation der Gentranskription, die direkte Beeinflussung von Signalkaskaden wie beispielsweise Bindung an Membranproteinen wie Integrin  $\alpha\beta3$ , die Wirkung auf mitochondriale Gene oder den Einfluss auf das Zytoskelett und die Zellmigration bewirkt [34]. Der Einfluss auf die Transkription durch T3 und T4 funktioniert über die Bindung an nukleäre Schilddrüsenhormonrezeptoren (TRs) [34]. Hierfür lösen sich die hydrophoben Hormone von den Transportproteinen im Blut und passieren nicht nur wie lange angenommen passiv, sondern auch mit Hilfe von speziellen T3/T4 Transportern die Zellmembran [35, 36]. Bisher wurden 3 Transporterfamilien identifiziert: 1. Monocarboxyltransporter (MCT8 und MCT10), 2. Organo-Anion-Transporter (OATP1, OATP4 und OATP6) und 3. L-Type Aminosäuren Transporter (LAT) [36, 37]. Von besonderer klinischer Bedeutung ist der MCT8-Transporter, der im Gehirn exprimiert wird [35]. Ein Defekt von MCT8 geht mit dem AHD-Syndrom (Allan-Herndon-Dudley-Syndrom) einher, einer schweren angeborenen geistigen und motorischen Entwicklungsstörung, wobei ein Zusammenhang mit der mangelhaften Wirkung des T3 durch den gestörten Transports nach intrazellulär während der Neurogenese angenommen wird [36, 38]. Damit T3 und T4 nach erfolgreicher Zellmembranpassage an den TRs binden können, wird T4 mit Hilfe von *Deiodinasen* zu T3 umgewandelt [35, 36]. Obwohl T4 in größeren Mengen vorliegt, besitzen die TRs eine höhere Affinität zu T3, weshalb man auch bei T3 von der bioaktiven Form spricht [39]. Bei den *Deiodinasen* werden zwischen Typ 1 (DIO1), Typ 2 (DIO2) und Typ 3 (DIO3) unterschieden [35, 36]. DIO1 und DIO2 deiodieren T4 in das wirksamere T3, DIO3 hingegen wandelt T4 in das unwirksame reverse T3 um, wodurch die Schilddrüsenhormonwirkung reguliert und limitiert werden kann [35, 36]. Im Zellkern kann durch die Bindung von T3 an den TR die Transkription zahlreicher Gene

beeinflusst werden [35, 36]. Ein Zielgen ist beispielsweise die Kalzium-Calmodulin-abhängige Kinase IV (CamKIV), die eine Rolle bei der Reifung und Proliferation von GABAnergen Interneuronen im Fötus spielt und somit wichtig ist für die neuronale Entwicklung [35, 40].

### **2.1.3 Schilddrüsenhormonbiosynthese**

Die Schilddrüsenhormone T3 und T4 entstehen durch die Iodierung von TG [16] (Abbildung 3). Hierfür wird die Vorstufe TG in den Follikelepithelzellen aus Tyrosin synthetisiert und über Exozytose in das Follikellumen abgegeben [16, 33]. Iod hingegen muss über die Nahrung wie beispielsweise iodhaltigem Speisesalz, iodhaltige Milchprodukte oder Meeresfrüchte aufgenommen werden [41]. Besonders in der Schwangerschaft und Stillzeit ist die ausreichende Iodzufuhr für die Entwicklung des Kindes wichtig [41]. Es konnte gezeigt werden, dass sich eine zusätzliche Iodzufuhr von 150 µg/Tag bei stillenden Müttern positiv auf die kognitiven Fähigkeiten des Kindes auswirkt [42]. Das aufgenommene Iod wird in Form von Iodid (I<sup>-</sup>) aus dem Blut unter anderem mit Hilfe des an der basolateralen Membran gelegenen Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> Symporters (NIS/SLC5A5) in die Thyreozyten transportiert [43, 44]. Von dort aus gelangt es über das Transportprotein Pendrin (SLC26A4) in der apikalen Zellmembran ebenfalls in das Follikellumen [44]. Im Follikellumen läuft dann die Iodierung von TG mit Hilfe des Enzyms Thyreoperoxidase (TPO) in drei wesentlichen Schritten ab: Zuerst wird I<sup>-</sup> zu I<sub>2</sub> oxidiert. Für diese Reaktion benötigt das Enzym TPO Wasserstoffperoxid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches durch Dualoxidase 2 (DUOX2) und Dualoxidase-maturation-factor 2 (DUOXA2) generiert wird [45, 46]. Anschließend werden die so gewonnenen I<sub>2</sub>-Moleküle mit den Tyrosinresten von TG verknüpft, wodurch Monoiodtyrosin (MIT) und Diiodtyrosin (DIT) entstehen. Zum Schluss werden durch das Zusammenführen von MITs und DITs und unter Abspaltung von Alanin die an TG gekoppelten Schilddrüsenhormone T3 und T4 synthetisiert [16, 33] (Abbildung 3). In dieser Form werden sie auch im Follikellumen gespeichert [33, 47]. Bei Bedarf wird die Speicherform von T3 und T4 über Endozytose in die Thyreozyten aufgenommen und durch Verschmelzung mit einem Lysosom proteolytisch wieder in DITs, MITs und T3 oder T4 gespalten [16, 48]. Die lipophilen Schilddrüsenhormone T3 und T4 können anschließend in die Blutbahn abgegeben werden [33]. Mit Hilfe von Plasmaproteinen, vor allem Albumin, Transthyretin (TTR, Thyroxin bindendes Präalbumin) und Thyroxin-bindendes Globulin (TBG) werden sie zum Zielort transportiert und regulieren die Transkription der Zielgene (siehe 2.1.2) [16, 33]. T4 kann in geringen Mengen auch ungebunden transportiert werden [33]. In der Schwangerschaft kommt es aufgrund des

erhöhten Bedarfs zu einer vermehrten Bildung von TBG und dadurch zu einer erhöhten Bindung von T3 und T4 [16]. Von den intrazellulär verbliebenen DITs und MITs kann durch die Iodotyrosin-Dehalogenase DEHAL1 (IYD) Iod abgespalten und wiederverwendet werden [49].

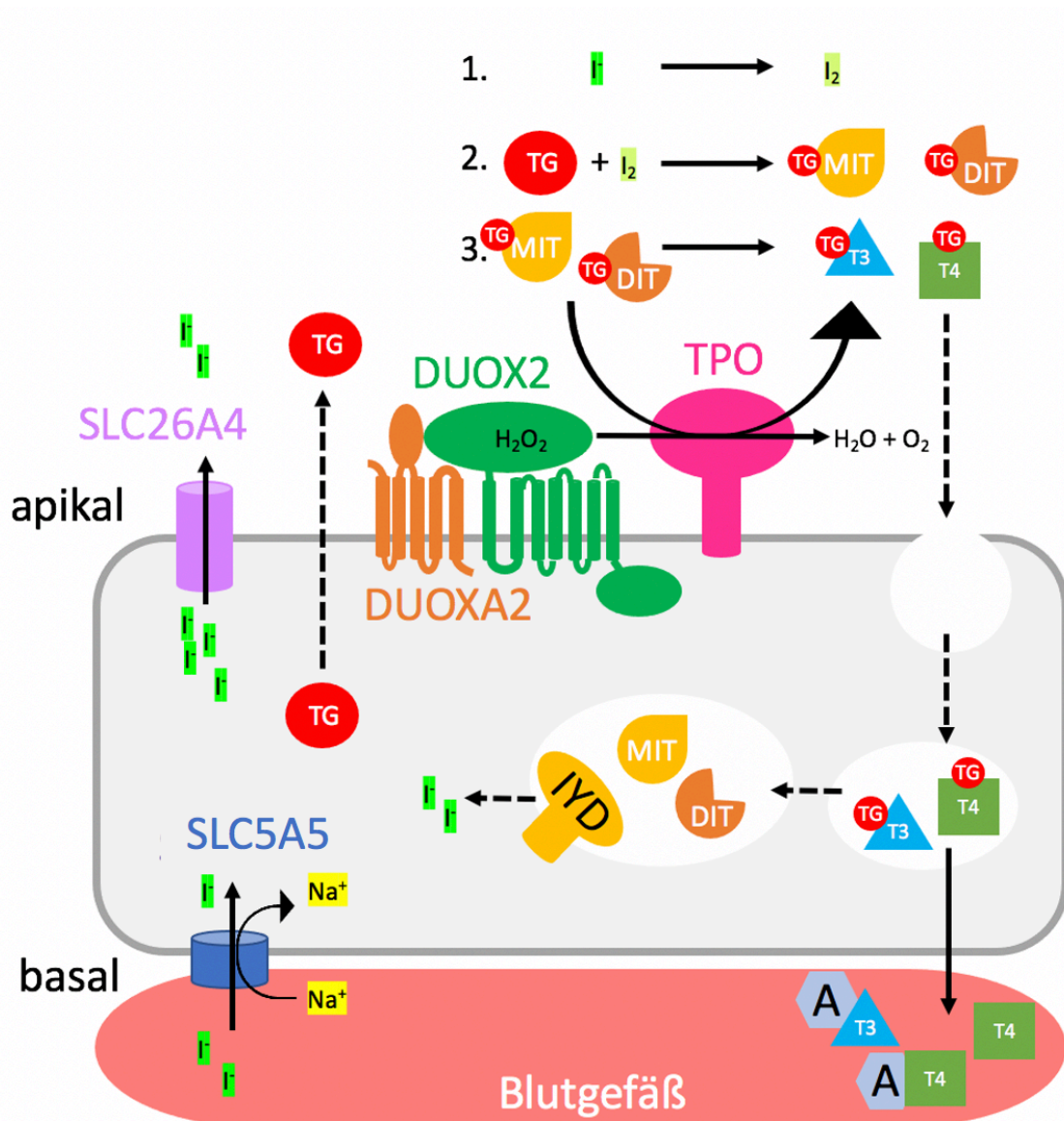


Abbildung 3: Schilddrüsenhormonsynthese: Die Schilddrüsenhormone werden im Follikellumen durch die Iodierung von Thyroglobulin synthetisiert. Iod wird hierfür über die Nahrung aufgenommen und durch SLC5A5 in die Zelle geschleust. SLC26A4 transportiert das Iod in das Follikellumen. Thyroglobulin wird von den Follikel epithelzellen selbst produziert und in das Lumen abgegeben. Die Synthese läuft mit Hilfe von TPO in 3 wesentlichen Schritten ab: 1. Iod wird zu Iodid oxidiert, 2. Thyroglobulin und Iodid werden miteinander verknüpft und es entstehen MIT und DIT, 3. Durch die Verknüpfung von MITs und DITs entstehen die Schilddrüsenhormone T3 und T4 gebunden an TG. Die Speicherform kann bei Bedarf von der Zelle aufgenommen werden und nach Abspaltung von TG im Lysosom als T3 und T4 ins Blut abgegeben werden. Dort gelangen sie meist gebunden an Transportproteine wie z.B. Albumin zu ihrem Zielort. Durch die proteolytische Spaltung im Lysosom kann die Speicherform auch wieder in MITs und DITs aufgespalten werden. Das gebundene Iodid kann weiterhin durch IYD getrennt werden und für die erneute Synthese von T3 und T4 zur Verfügung gestellt werden. TG= Thyroglobulin, TPO= Thyroperoxidase, SLC26A4= Pendrin (PDS), SLC5A5= Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>-Symporters (NIS), DUOXA2= Dualoxidase maturation factor 2, DUOX2= Dualoxidase 2, IYD= Iodotyrosin-Dehalogenase 1 (DEHAL1), MIT= Monoiodtyrosin, DIT= Diiodtyrosin, T3= Trijodthyronin, T4= Thyroxin, A=Albumin; modifiziert nach [50]

### 2.1.4 Hormonregelkreis

Die Ausschüttung der Schilddrüsenhormone wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse reguliert [16]. Der Hypothalamus produziert und sezerniert das Hormon TRH (Thyrotropin-Releasing Hormon), wodurch in der Adenohypophyse über die Bindung an den TRH-Rezeptor die Transkription von TSH (Thyroid-Stimulating Hormon) gefördert wird [33]. TRH kann außerdem in der Adenohypophyse zu einer erhöhten Prolaktinausschüttung führen [16, 33]. Das produzierte TSH gelangt anschließend über die Blutbahn von der Hypophyse zu den Follikelepithelzellen der Schilddrüse, wo es an den TSH-Rezeptor bindet [33, 51]. TSH fördert das Schilddrüsenwachstum, die Hormonbildung und die Hormonausschüttung in der Schilddrüse [16, 51].

Gleichzeitig wird die Produktion von TRH und TSH durch erhöhte T3- und T4- Werte im Blut durch einen negativen Feedbackmechanismus gehemmt [51]. Andere Einflüsse und Hormone können ebenfalls die Bildung von TRH und TSH beeinflussen, so wird beispielsweise die Sekretion von TSH durch Dopamin, Glukokortikoide und Somatostatin gehemmt und durch Östrogene und Noradrenalin gefördert [16, 33].

Dieser Feedbackmechanismus wird auch in der Diagnostik angewendet, um zwischen primären Schilddrüsenerkrankungen, bei der das Organ selbst betroffen ist und sekundären bzw. tertiären Schilddrüsenerkrankungen, bei denen der Defekt in der Hypophyse bzw. im Hypothalamus liegt, zu unterscheiden [33] (siehe Tabelle 1).

	TSH	T3/T4
Primäre Hypothyreose	hoch	niedrig
Sekundäre Hypothyreose	niedrig	niedrig
Tertiäre Hypothyreose	niedrig	niedrig

	TSH	T3/T4
Primäre Hyperthyreose	niedrig	hoch
Sekundäre Hyperthyreose	hoch	hoch
Tertiäre Hyperthyreose	hoch	hoch

Tabelle 1: TSH-, T3- und T4-Werte bei primärer, sekundärer und tertiärer Hypo- und Hyperthyreose

## **2.2 Kongenitale Hypothyreose**

Die kongenitale Hypothyreose (CH) ist eine angeborene Dysfunktion, die in einer Unterversorgung des Körpers mit Schilddrüsenhormonen resultiert [52]. Mit einer Inzidenz von ca. 1:2000 bis 1:4000 entspricht sie der häufigsten angeborenen Endokrinopathie [1, 52, 53]. Ein Mangel an Schilddrüsenhormonen T3 und T4 in den ersten zwei Lebensjahren hat einen negativen Einfluss auf die geistige und körperliche Entwicklung des Kindes, was durch frühzeitige Diagnostik und Behandlung vermeidbar ist [2, 25]. Aus diesem Grund und wegen einem meist asymptomatischen Bild bei Geburt wird seit Mitte der 70er Jahre im Rahmen des Neugeborenen Screenings auf CH getestet [54]. Trotz des großen Therapieerfolgs durch das Screening, der sich in einer normalen Entwicklung der Kinder äußert, weisen einige betroffene Kinder signifikante Unterschiede in motorischer Koordination, globaler motorischer Leistungsfähigkeit und IQ, verglichen mit Gesunden, auf [55]. Diese Abweichung erklärt sich vermutlich durch unterschiedliche Schweregrade der Hypothyreose, späten Therapiebeginn oder zu geringe Therapiedosis [55].

Im Folgenden soll näher auf die Epidemiologie, das symptomatische Bild der Erkrankung, die Ätiologie, die Diagnostik und Therapie von angeborener Hypothyreose sowie auf die genetischen Ursachen mit Fokus auf der Hormonbiosynthesestörung eingegangen werden.

### **2.2.1 Epidemiologie**

Frauen sind von der Diagnose CH doppelt so häufig betroffen wie das männliche Geschlecht [56]. Die Inzidenz von CH ist abhängig vom Herkunftsland, der ethnischen Zugehörigkeit einer Bevölkerung sowie der dort angewandten Screening Strategie [1, 52]. Insgesamt liegt die Inzidenz weltweit zwischen 1:2000 und 1:4000 [1, 52]. In Deutschland betrug die Prävalenz für das Jahr 2019 1:3016 Neugeborenen [57]. In Ländern mit einem hohen Anteil an Blutsverwandtschaft liegt sie deutlich höher, z.B. wurde im Iran eine Häufigkeit von 1:748 gemessen [1, 58].

### **2.2.2 Klinisches Erkrankungsbild und Ätiologie**

#### *Klinisches Erkrankungsbild*

An CH erkrankte Kinder zeigen bei der Geburt meist ein klinisch unauffälliges Bild [3, 59]. Da die Versorgung mit Schilddrüsenhormonen intrauterin bis zu 50 % der normalen T4-Konzentration durch die Mutter erfolgen kann, sind die erkrankten Neugeborenen in der Regel asymptomatisch [60]. Es wurden subtile Auffälligkeiten

wie eine reduzierte Variabilität der fetalen Herzfrequenz und höheres Geburtsgewicht beschrieben, die mit CH gehäuft in Zusammenhang gebracht werden [61, 62]. Erkennbare klinische Symptome wie Makroglossie, Umbilikalhernie, Hypotonie, Lethargie, Icterus prolongatus, Trinkschwäche, Obstipation, teigiges Hautbild sowie vergrößerte Fontanellen zeigen sich hingegen selten [63]. Eine direkte Blickdiagnose ist auf Grund der unspezifischen Symptome sehr schwer.

Es gibt klinische Auffälligkeiten, die Rückschlüsse über die Ätiologie der CH zulassen. So geht eine CH aufgrund einer Hormonbiosynthesestörung meistens mit einer Struma bei Neugeborenen einher [52]. Andere für die Schilddrüsenanlagestörung ursächliche Mutationen in Kandidatengenomen gehen mit angeborenen Malformationen, die das Herz, den Urogenitaltrakt oder die Nieren betreffen, einher [52, 64, 65].

Unbehandelte Patienten zeigen im Verlauf ein symptomatisches Bild aus mentaler Retardierung, Kleinwuchs, Skelettfehlbildungen, Sprachstörungen oder Schwerhörigkeit [66, 67]. Das Vollbild der unbehandelten CH wird als Kretinismus bezeichnet [66].

### *Ätiologie*

Eine CH kann durch verschiedenste Mechanismen, die Auswirkungen auf die Schilddrüsenhormonfunktion haben, verursacht werden.

Am häufigsten liegt die Störung bei der Schilddrüse selbst, wobei vor allem zwischen einer Anlagestörung und einer Hormonbiosynthesestörung unterschieden wird [4, 68]. Die Dysgenese ist als Hypoplasie, Ektopie oder Aplasie der Schilddrüse definiert [68]. In den meisten Fällen tritt sie sporadisch auf [69, 70]. Bei der Hormonbiosynthesestörung können trotz einer normal angelegten Schilddrüse oder einer vergrößerten Schilddrüse (Struma), häufig aufgrund einer genetischen Ursache, nicht ausreichend Schilddrüsenhormone synthetisiert werden [50]. Bisher wurde die Anlagestörung mit ca. 80-85% der Fälle als häufigster Auslöser für eine primäre CH angesehen [4]. Neuere Studien hingegen zeigen, dass in Bevölkerungsgruppen wie in Italien und Mazedonien der größere Anteil der Patienten mit CH eine normale oder vergrößerte Schilddrüse („Gland in situ“) aufweist. [5, 6, 8].

Von der permanenten CH lässt sich eine transiente Form der CH abgrenzen [71]. Mögliche Ursachen hierfür sind ein Iod-Defizit durch eine mütterliche Mangelernährung während der Schwangerschaft, ein pränataler Iod-Überschuss, mütterliche blockierende TSH-Rezeptor-Antikörper, die nach der Geburt in Kindern von

autoimmunerkrankten Müttern persistieren, sowie in seltenen Fällen *DUOX2*-Mutationen [72-75].

Außerdem können Störungen im Bereich des Hypothalamus oder der Hypophyse eine zentrale Form der CH induzieren [76]. Diese Form tritt mit einer Inzidenz von 1:20000 deutlich seltener auf [76, 77]. Problematisch ist hier jedoch, dass durch normale bis niedrige TSH-Werte die zentrale Hypothyreose im TSH-Neugeborenen-Screening unerkannt bleibt [56].

### **2.2.3 Diagnostik und Therapie**

Die frühzeitige Diagnostik und optimale Therapie der angeborenen Hypothyreose ist essenziell zur Vermeidung von irreversiblen neurologischen Defiziten und Wachstumsstörungen [2, 78].

#### *Diagnostik*

Bei der primären angeborenen Hypothyreose kommt es zu erhöhten TSH-Werten und erniedrigten T<sub>4</sub>-/T<sub>3</sub>-Werten [79]. Im Rahmen des Neugeborenen-Screening wird zuerst der TSH-Wert bestimmt [80]. Hierfür wird Kapillarblut aus der Ferse des Neugeborenen am 2.-3. Lebenstag (zwischen der 36. und 72. Lebensstunde) auf ein Filterpapier getropft und auf angeborene Stoffwechselerkrankungen und Endokrinopathien, darunter auch die CH, untersucht [80]. Durch die Bestimmung des TSH-Wertes kann eine primäre Schilddrüsenfunktionsstörung vermutet werden [52]. In Deutschland liegt der Grenzwert meist bei 15 mU/l, wobei altersentsprechende Normwerte beachtet werden müssen [79, 81].

Bei einem auffälligen TSH-Wert im Neugeborenen-Screening wird eine Konfirmationsdiagnostik mit Messung von TSH, freiem T<sub>4</sub> (fT<sub>4</sub>) oder Gesamt T<sub>4</sub> (tT<sub>4</sub>) und T<sub>3</sub> im Blutserum durchgeführt [52, 79]. Diese Diagnostik wird auch dann empfohlen, wenn das Neugeborenen-Screening negativ ist, jedoch klinisch auffällige Symptome bestehen [79]. Ein weiterer Sonderfall sind Frühgeborene vor der 32. Schwangerschaftswoche [80]. Sie neigen im Vergleich zu Reifgeborenen zu falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen [80]. Gründe hierfür können Fluktuationen der Schilddrüsenhormonkonzentrationen in den ersten Lebenswochen, die Unreife der Hypophysen-Hypothalamus-Achse, nicht schilddrüsenbedingte Erkrankungen oder Komplikationen von Frühgeburten wie beispielsweise Respiratory Distress Syndrome (RDS) sein [82-85]. Deshalb wird bei Frühgeborenen neben dem Screening eine Kontrolluntersuchung zwischen der 2.-4. Woche, frühestens nach dem 7. Lebenstag

empfohlen [80, 86]. Die zentrale Hypothyreose wird im TSH-Screening nicht erkannt, wie oben bereits erwähnt [56].

Wird im Blutserum neben einem erhöhten TSH-Wert ein erniedrigter T4-Wert gemessen, so ist die Diagnose CH bestätigt und die Therapie muss begonnen werden [52]. Für den T4-Wert kann sowohl tT4, als auch fT4 verwendet werden [79]. Der fT4-Spiegel ist durch eine geringere Abhängigkeit vom Gestationsalter bei Frühgeborenen, vom postnatalen Alter sowie dem Schweregrad der Komorbiditäten intensivpflichtiger Patienten der tT4-Bestimmung überlegen [81, 87, 88].

Geht ein erhöhter TSH-Wert hingegen mit einem normalen T4-Wert einher, wird zu einer weiteren Kontrolluntersuchung nach einer Woche geraten [52]. Eine alleinige TSH-Erhöhung kann eine Normvariante darstellen und zeigt keinen direkten Behandlungsbedarf an [79, 89]. Eine Ausnahme sind sehr hohe TSH-Werte ( $\text{TSH} > 20 \text{ mU/l}$ ), hier wird ebenfalls der Beginn der Behandlung empfohlen [52].

Der T3-Wert im Blutserum kann zusätzlich bestimmt werden [79]. Eine Erniedrigung von T3 zeigt sich jedoch erst bei einer schweren CH, da zu Beginn der Unterfunktion noch ausreichend T3 aus T4 produziert wird [79]. Aus diesem Grund eignet sich der T3-Wert besser zur Abschätzung des Schweregrades der Hypothyreose als zur Detektion [79].

Zur Sicherung der Diagnose und Klärung der Ursache können weitere diagnostische Maßnahmen erfolgen, ohne jedoch den Therapiebeginn zu verzögern [52]. Das ist im Hinblick auf die Therapie wichtig, da dadurch beispielsweise Auslassversuche oder eine lebenslang notwendige Therapie abgewogen werden können und sich bei geklärter Ursache die Compliance der Patienten erhöht [52, 79]. Ein diagnostisches Mittel ist die Bildgebung, die eine Unterscheidung zwischen einer Anlagestörung und einer Schilddrüsenunterfunktion bei morphologisch normaler bis vergrößerter Schilddrüse erlaubt [90]. In der Regel wird zuerst die Durchführung einer Sonographie empfohlen, die als nicht-invasive Methode eine hohe Sensitivität diesbezüglich aufweist [91, 92]. Das Verfahren der Szintigraphie eignet sich besser in der Diagnostik von Anlagestörungen als der Ultraschall [52]. Zusätzlich kann die Bestimmung des TG-Wertes zur Klärung der Frage, ob eine Athyreose, eine Hypoplasie oder eine Ektopie vorliegt, erfolgen [90, 93]. Falls TG im Blut trotz nicht sichtbarem Schilddrüsengewebe nachgewiesen wird, ist eine Ektopie wahrscheinlich [90]. Bei dem Nachweis von blockierenden TSH-Rezeptor-Antikörpern kann im Verlauf ein Therapie-Auslassversuch erwägt werden, da eine transiente Form der Hypothyreose mit

maternalen Antikörpern möglich ist, die nicht länger als 3 Monate im Blut der Neugeborenen persistieren [94, 95]. Weiterhin sollte bei normal angelegter Schilddrüse eine Iod-Anamnese durchgeführt werden, um sowohl einen Iod-Defizit als auch einen Iod-Überschuss auszuschließen [72, 73]. Außerdem ist es wichtig, eine thyreostatische Behandlung der Mutter während der Schwangerschaft, beispielweise im Rahmen eines Morbus Basedows, abzuklären. Die Einnahme von Thyreostatika während der Schwangerschaft kann bei dem Neugeborenen ebenfalls eine Schilddrüsenunterfunktion verursachen [96]. Sind bei einer CH mit einer normal angelegten oder vergrößerten Schilddrüse weder TSH-Rezeptor Antikörper nachweisbar noch besteht eine auffällige Anamnese, so ist ein Hormonsynthesedefekt wahrscheinlich [79].

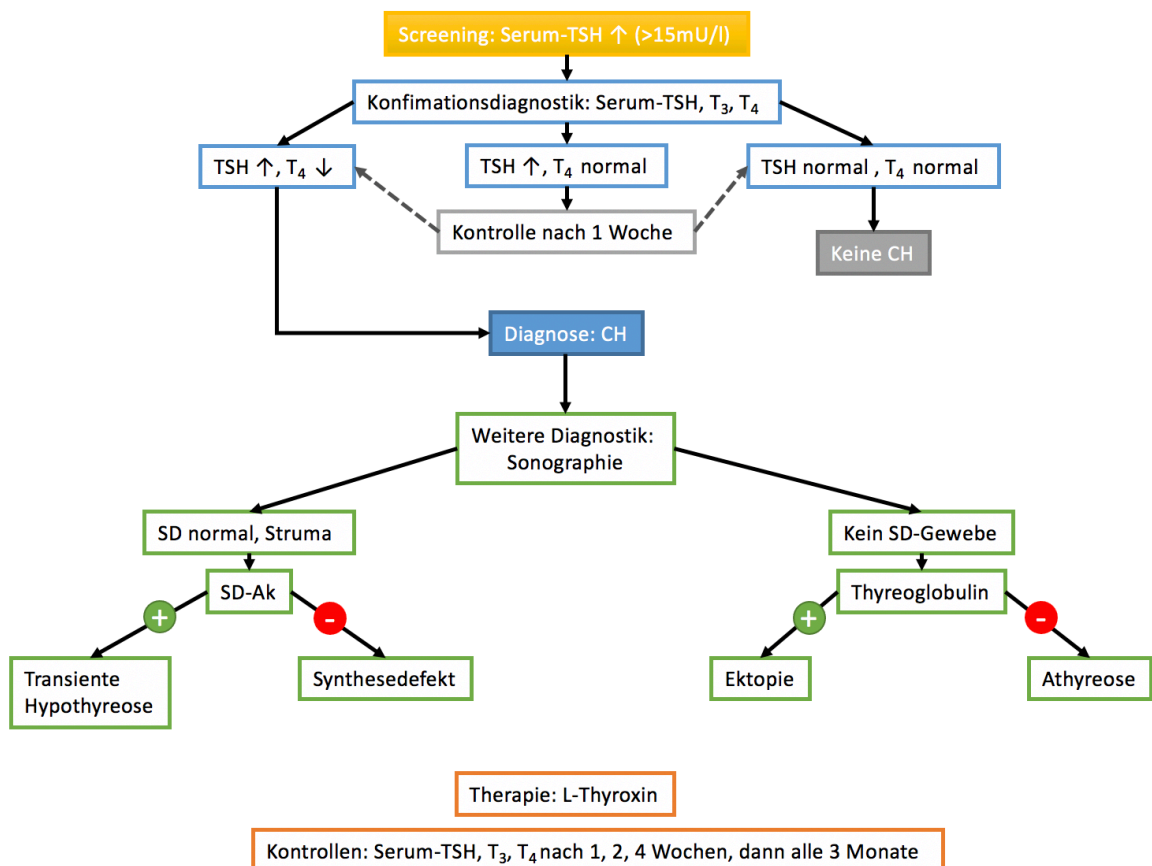


Abbildung 4: Diagnostikschema der angeborenen Hypothyreose: Wird im Neugeborenen-Screening ein Blutserum-TSH von >15mU/l gemessen, so folgt eine Konfirmationsdiagnostik mit Bestimmung von Blutserum-TSH, -T3 und -T4. Ein erhöhter TSH-Wert bei gleichzeitiger T4-Erhöhung bestätigt die Verdachtsdiagnose CH. Wird nur ein erhöhter TSH-Wert bei normalem T4-Wert gemessen, erfolgt eine Kontrolle nach 1 Woche. Normale TSH- und T4-Werte zeigen, dass keine CH vorliegt. Bei der Diagnose CH, wird zur Ursachenklärung weitere Diagnostik empfohlen. Durch die Sonographie lassen sich Patienten mit vorhandener SD oder vergrößerter SD von Patienten mit SD-Anlagestörung in der Bildgebung abgrenzen. Weiterhin kann bei vorhandenem SD-Gewebe die Bestimmung der SD-Ak erfolgen, um eine durch blockierende TSH-Rezeptor-Antikörper bedingte Hypothyreose von einem Schilddrüsenhormonsynthesedefekt zu unterscheiden. Bei fehlendem SD-Gewebe kann das Thyreoglobulin im Blutserum gemessen werden. Ist TG nachweisbar, ist von einer ektopen SD auszugehen. Bei nicht messbaren TG-Werten, liegt eine Athyreose vor. Die Therapie der CH erfolgt mit L-Thyroxin. Kontrollen zur Verlaufsbeobachtung und Therapieanpassung werden in folgendem Schema empfohlen: nach 1, 2, 4 Wochen und dann alle 3 Monate in den ersten 2 Lebensjahren. SD= Schilddrüse, TSH= Thyroid Stimulating Hormon, T3= Trijodthyronin, T4= Thyroxin, SD-Ak= Schilddrüsenantikörper, TG= Thyreoglobulin, + = vorhanden, - = nicht vorhanden; modifiziert nach [97]

## Therapie

Die Therapie von CH erfolgt mit der oralen Gabe von L-Thyroxin (T4) [52]. L-Thyroxin kann mit Hilfe der *Deiodinasen* am Zielort in das biowirksame T3 umgewandelt werden [98]. Die Gabe von T4 und T3 als Kombination hat gegenüber der Monotherapie mit T4 keinen Vorteil gezeigt [99]. Das Medikament sollte einmal täglich als Tablette bzw. bei Neugeborenen auch als Tropfen eingenommen werden [52, 100]. Im Gegenteil zur Einnahme bei Erwachsenen, hier sollte die Tablette morgens vor der Nahrungsaufnahme erfolgen, kann L-Thyroxin bei Neugeborenen und Kleinkindern zusammen mit dem Essen eingenommen werden [52, 98]. Wichtiger hingegen ist eine regelmäßige

Einnahme zur täglich gleichen Uhrzeit, um eine konstante Aufnahmekonzentration zu erreichen [52].

Die Therapie sollte frühestmöglich nach Diagnosestellung, am besten innerhalb der ersten 14 Lebenstage, begonnen werden [52]. Eine prospektive Studie zeigte bessere Ergebnisse des Bayley Mental Development Index (MDI) bei Kindern, die vor dem 13. Lebenstag behandelt wurden [101].

Die aktuelle Empfehlung der Therapiedosis liegt laut europäischen und amerikanischen Fachgesellschaften bei 10-15 µg/kg/Tag [52, 56]. Die Dosierung wird vor allem anhand des Schweregrades der CH festgelegt [52]. Patienten mit einer schweren CH ( $fT_4 < 5 \text{ pmol/l}$  in Kombination mit erhöhten TSH-Werten) sollten mit der höchsten Anfangsdosis mit 10-15 µg/kg/Tag therapiert werden, wohingegen bei milderer Ausprägung ( $fT_4 > 10 \text{ pmol/l}$  in Kombination mit erhöhten TSH-Werten) mit 10 µg/kg/Tag begonnen werden kann [52]. Jedoch wird die optimale Dosierung immer noch diskutiert und es gibt bisher kein abschließendes Ergebnis, wie eine Metaanalyse der Cochrane Library zeigt [102].

Eine wichtige Säule in der Behandlung von CH stellt die Therapiekontrolle mittels der Messung der  $fT_4$ - und TSH-Konzentration im Blutserum dar [103]. Hierbei gilt es die altersentsprechenden Normwerte zu beachten [104]. Eine erste Kontrolle sollte 1-2 Wochen nach Therapiebeginn erfolgen [52]. Anschließend werden die Patienten bis zur Normalisierung des TSH-Wertes alle 2 Wochen untersucht [52]. Nach Normalisierung des TSH-Wertes wird eine ärztliche Kontrolle alle 1-3 Monate bis zum vollendeten ersten Lebensjahr empfohlen [52]. Bei unkompliziertem Verlauf kann die Häufigkeit stetig reduziert werden. Bis zum 3. Lebensjahr wird eine Untersuchung alle 2-4 Monate angeraten und danach bis zum abgeschlossenen Wachstum alle 3-6 Monate [52]. Ob die Therapiedosis angepasst werden soll, wird je nach klinischem Verlauf individuell entschieden [52]. Eine Reduktion der L-Thyroxin Therapie sollte dabei nur bei TSH-Werten unterhalb des altersentsprechenden Referenzwertes oder Zeichen einer Überdosierung, wie beispielsweise Tachykardie, erfolgen und nicht nur bei leicht erhöhten  $fT_4$  Werten [52]. Eine Kontrolle nach Anpassung der Therapiedosis ist nach 4-6 Wochen durchzuführen [56].

Konnte bei der Diagnosestellung der CH keine Ursache für eine permanente CH gefunden werden, so ist eine Reevaluation der Diagnose im Alter von 2-3 Jahren indiziert [52, 79]. Dies gilt insbesondere dann, wenn eine normal angelegte Schilddrüse nachweisbar ist [105, 106]. Hierzu wird ein Auslassversuch der Therapie

von 4-6 Wochen mit anschließender Bestimmung von TSH und fT4 durchgeführt [52]. Bei einem TSH-Wert  $\geq 10$  mU/l gilt die primäre CH als bestätigt und eine ergänzende Diagnostik mittels Bildgebung und Gendiagnostik zur Klärung der Ursache sollte durchgeführt werden [52]. Liegt der TSH-Wert unterhalb von 10 mU/l, aber über dem oberen Referenzbereich, so kann der Auslassversuch 3-4 Wochen fortgesetzt werden und anschließend erneut bewertet werden [52]. Ein früher Auslassversuch kann außerdem bei Neugeborenen ohne permanente CH-Diagnose und normal angelegter Schilddrüse bereits im Alter von 6 Monaten erwogen werden, vorausgesetzt die L-Thyroxin-Dosis liegt unterhalb von 3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$  [105, 106].

#### **2.2.4 Genetische Ursachen**

Eine Gendiagnostik kann zur genaueren Klärung der molekularen Ursache der Erkrankung durchgeführt werden [79]. Dadurch wird nicht nur die prognostisch wichtige Compliance bezüglich der Medikamenteneinnahme gefördert, sondern es werden auch individuelle Behandlungskonzepte, beispielsweise zur Verhinderung eines Strumawachstums, und eine gezielte interdisziplinäre medizinische Betreuung ermöglicht [52, 79, 107]. Außerdem kann die Wahrscheinlichkeit über einen transienten oder permanenten Verlauf der CH prognostiziert sowie über assoziierte Erkrankungen aufgeklärt werden [50, 52]. Die Gendiagnostik ist vor allem dann angebracht, wenn ein gehäuftes Auftreten von CH innerhalb einer Familie beobachtet wird oder bei Patienten mit CH assoziierten Auffälligkeiten, wie z.B. Schwerhörigkeit [107].

Wie bereits unter 2.2.2 beschrieben, wird bei den Ursachen der primären CH vor allem zwischen Anlagestörung und Hormonbiosynthesestörung unterschieden [4, 68]. Während Anlagestörungen meist sporadisch auftreten und nur in bis zu 5% der Fälle mit genetischen Ursachen zusammenhängen, sind bei den Hormonbiosynthesestörungen häufig Genmutationen für die CH verantwortlich [108]. Mit Schilddrüsendysgenese assoziierte Gene sind vor allem *PAX8*, *FOXE1*, *NKX2-1*, *NKX2-5*, *GLIS3*, *JAG1*, *CDCA8*, *TSHR*, *NTN1* und *TUBB1* [52, 68]. Mutationen in diesen Genen können abhängig vom betroffenen Gen durch autosomal-rezessive und autosomal-dominante Erbgänge eine CH verursachen [52]. Die Hormonbiosynthesestörungen hingegen werden meistens durch autosomal-rezessive Vererbung von Mutationen in den Genen *SLC5A5*, *SLC26A4*, *TG*, *TPO*, *DUOX2*, *DUOXA2* und *IYD* hervorgerufen [50]. Im Folgenden soll näher auf diese

Kandidatengene für Hormonbiosynthesestörung und ihr klinisches Bild eingegangen werden.

### *SLC5A5/NIS*

Das *SLC5A5*-Gen codiert für einen Natrium/Iodid-Symporter (NIS), der an der basolateralen Membran der Schilddrüsenfollikel­epithelzelle Iod aktiv aus dem Blut in die Zelle transportiert [109] (Abbildung 3). Das Glykoprotein besteht aus 13 Transmembranproteinen und wird außer in der Schilddrüse auch im Magen, den Speicheldrüsen sowie in der laktierenden Brust exprimiert [110]. Bei Patienten mit mutiertem NIS ist der Iodtransport gestört, was sich in einer Szintigraphiediagnostik als geringe bis fehlende Anreicherung von radioaktivem Iod in der Schilddrüse zeigt [109, 111]. Dennoch kann durch die TSH-Stimulation der Defekt mit einer Struma einhergehen [109]. Das Erkrankungsalter der Patienten mit mutierten *NIS* kann variieren und hängt maßgeblich von der Restaktivität des Proteins und der Iodversorgung des Patienten ab [112]. Aus diesem Grund können Patienten ein normales Neugeborenen­screening aufweisen und erst später durch Symptome auffallen [68]. Bezüglich der Therapie wurde festgestellt, dass Patienten mit einer NIS-Restaktivität neben L-Thyroxin von einer zusätzlichen Iodsupplementation profitieren und auch eine Iod-Monotherapie möglich ist [50].

### *SLC26A4/PDS*

*SLC26A4* oder Pendrin (PDS) ist ein multifunktionaler Anionenaustauscher, der in der Schilddrüse, im Innenohr, in der Niere, in den Speicheldrüsen und in den Atemwegen exprimiert wird [12, 48]. In der Schilddrüse wird in der apikalen Membran über PDS Iod in Form von  $I^-$  aus der Zelle in das Follikellumen abgegeben, wo die Schilddrüsenhormonbiosynthese erfolgt [13] (Abbildung 3). Im Innenohr beeinflusst das Protein durch den  $Cl^-/HCO_3^-$  Austausch die Zusammensetzung der Endolymphe [13]. Außerdem haben Patienten mit einem mutierten *PDS* in vielen Fällen eine Mondini-Malformation und einen erweiterten vestibulären Aquaedukt [113]. Ein Funktionsverlust von PDS kann sich klinisch als Pendred-Syndrom, eine angeborene meist beidseitige Schwerhörigkeit, die mit einer Struma einhergeht, äußern [13, 114]. Der Phänotyp bei *SLC26A4* Mutationen kann allerdings sehr variabel sein [50, 115]. So kann neben dem Pendred-Syndrom auch ein Hörverlust mit normaler Schilddrüsenfunktion oder nur eine Schilddrüsenmanifestation auftreten [50, 115]. Die Form der Hypothyreose ist meistens mild, wodurch die Gefahr besteht, im Neugeborenen­screening nicht erkannt zu werden [48]. Die Struma entsteht häufig erst

im Verlauf der Kindheit, kann aber auch unmittelbar postpartal auffallen [116]. Außerdem kann der Phänotyp durch die Einnahme von Iod positiv beeinflusst werden [50].

### *TG*

TG ist das häufigste in der Schilddrüse vorkommende homodimere Glykoprotein und dient im iodierten Zustand als Speicherform der Schilddrüsenhormone [50] (Abbildung 3). Durch Mutationen im *TG*-Gen können sowohl quantitative als auch funktionelle Defekte des TG Proteins, wie beispielsweise TG-Transportstörungen entstehen [48]. Klinisch können *TG*-Mutationen ein Spektrum von einem euthyreoten Stoffwechsel bis hin zu schweren Formen der CH verursachen [117]. Außerdem gehen sie häufig mit einer angeborenen Struma oder einer Struma, die kurz nach der Geburt auftritt, einher [118]. Charakteristisch für *TG*-Defekte ist ein fast immer sehr niedriger oder nicht nachweisbarer TG-Wert im Blutserum bei gleichzeitig erhöhtem TSH-Wert, weshalb in diesem Fall eine *TG*-Genuntersuchung empfohlen wird [50, 118]. Szintigraphisch zeigt sich eine hohe Anreicherung von radioaktivem Iod in der Schilddrüse [118].

### *TPO*

*TPO* ist das Schlüsselenzym der Schilddrüsenhormonbiosynthese [33]. Das Häm-Protein liegt als ein in der apikalen Membran verankertes Transmembranprotein vor und katalysiert in mehreren Schritten die Iodierung von TG [33, 119] (Abbildung 3). Mutationen im *TPO*-Gen sind eine der häufigsten Ursachen für eine Hormonbiosynthesestörung bei permanenter CH [120, 121]. Die meisten Patienten mit mutiertem *TPO* leiden unter einer schweren CH mit einer Struma, wobei auch Fälle ohne vergrößerte Schilddrüse oder sogar Hypoplasien beschrieben sind [119, 122, 123]. Diagnostisch gehen *TPO*-Defekte mit einem normalen bis hohen TG-Wert und einer hohen Iod-Anreicherung in der Szintigraphie einher [48, 120]. Bei diesen Patienten ist eine lebenslange Hormontherapie notwendig [50]. In der Schwangerschaft einer erkrankten Frau sollte zudem mittels Ultraschall nach einer fetalen Struma gescreent werden, um frühzeitig einen vererbten Defekt zu erkennen [50].

### *DUOX2/THOX2 und DUOXA2*

DUOX2 generiert als NADPH-Oxidase zusammen mit seinem Aktivierungsfaktor DUOXA2 Wasserstoffperoxid für TPO-katalysierte Reaktionen [45]. Der

Enzymkomplex ist in der apikalen Membran der Follikelepithelzellen lokalisiert [124, 125] (Abbildung 3).

Für Mutationen in *DUOX2* wurden bisher sowohl Fälle mit autosomal-rezessiver Vererbung als auch mit autosomal-dominantem Erbgang beschrieben, wobei bei krankheitsverursachenden heterozygoten Mutationen eine Haploinsuffizienz vermutet wird [68, 126]. Das klinische Bild kann sehr variabel sein und sowohl mit einer permanenten als auch vorübergehenden CH einhergehen [126, 127]. Ein möglicher Grund hierfür ist die kompensatorische Gewinnung von Wasserstoffperoxid durch *DUOX1*, wodurch eine Restaktivität erhalten bleibt [127]. In der Regel präsentieren sich Patienten mit *DUOX2*-Mutationen jedoch mit einer Struma, hohen TG-Werten und TSH-Werten sowie niedrigen fT4-Werten [128]. Therapeutisch ermöglicht eine gesteigerte Iod-Zufuhr das *DUOX1* generierte Wasserstoffperoxid besser zu nutzen [129]. Bei Patienten mit einer transienten CH aufgrund einer *DUOX2*-Haploinsuffizienz sollte auf die Schilddrüsenfunktion, besonders bei vermehrtem Iodbedarf z.B. in der Schwangerschaft, geachtet werden [50].

*DUOX2* wird weiterhin eine Rolle bei Schilddrüsenanlagestörungen und entzündlichen Darmerkrankungen zugeschrieben [52].

Mutationen in *DUOXA2*, dem Aktivierungsfaktor von *DUOX2*, äußern sich klinisch als milde permanente oder transiente CH [45, 68]. Die Vererbung erfolgt autosomal-rezessiv, wobei in einem Fallbeispiel eine heterozygote Mutation als Ursache für eine transiente CH angenommen wird [48, 130]. Auch hier wurden Kompensationsmechanismen durch *DUOXA1 in vitro* nachgewiesen [131]. Es benötigt jedoch noch weitere Untersuchungen von *DUOXA2* und Fallbeschreibungen, um den Pathomechanismus von *DUOXA2*-Mutationen genauer zu verstehen.

### *IYD (DEHAL1)*

Das Transmembranprotein Iodotyrosin-Dehalogenase 1 (*IYD/ DEHAL1*) ist in der apikalen Follikelepithelmembran lokalisiert und ermöglicht durch die Iodidabspaltung von MIT und DIT eine Wiederverwendung von Iod zur Schilddrüsenhormonbiosynthese [49] (Abbildung 3). Neben der Schilddrüse wird *IYD* auch in der Leber und Niere exprimiert [132]. Klinisch fallen Patienten mit einem *IYD*-Defekt erst durch eine Struma in der Kindheit auf, da das Neugeborenencreening unauffällig bleibt [133]. Diagnostisch können *IYD*-Mutationen außerdem mit einer erhöhten Sekretion von MITs und DITs im Urin und einer hohen Iodanreicherung in der Schilddrüse in der Szintigraphie einhergehen [133].

In den letzten Jahren wurde außerdem beobachtet, dass Patienten mit CH unabhängig von ihrem Phänotyp verschiedene Varianten in mehreren Kandidatengen der Anlage- und Hormonbiosynthesestörung aufwiesen [7, 134, 135]. Daraus wird geschlossen, dass es neben Mutationen in nur einem Kandidatengen auch polygene Ursachen für CH geben muss [134]. Das könnte ein möglicher Pathomechanismus bei sporadisch aufgetretenen Fällen von CH sein [134].

## 2.3 *SLC26A7*-Gen

Aufgrund früherer Studien wurde postuliert, dass die Anlagestörung den größten Anteil der primären CH verursacht [68]. Neuere Veröffentlichungen zeigen hingegen, dass die normal angelegte Schilddrüse (Glandula in situ /GIS) bei CH-Patienten häufiger vorkommt als bislang angenommen und in einigen Bevölkerungsgruppen wie in Italien und Mazedonien den größeren Anteil der Fälle ausmacht [5, 6, 8]. Die gestiegene Inzidenz von CH insgesamt und die Zunahme der GIS-Fälle lassen neben den bekannten Genmutationen bei Hormonbiosynthesestörungen weitere genetische Ursachen vermuten [7, 8, 68].

Im Rahmen moderner DNA-Sequenzierungstechniken (Next-Generation-Sequencing (NGS)) wurden Mutationen von *SLC26A7* neu bei CH-Patienten entdeckt [52]. Im Folgenden soll auf die *SLC26*-Genfamilie allgemein eingegangen werden sowie die Struktur und Funktion von *SLC26A7* näher beschrieben werden.

### 2.3.1 *SLC26* Genfamilie

Die Familie der *SLC26*-Transporter (solute linked carrier 26) umfasst 11 Gene: *SLC26A1-SLC26A11*, die mit Ausnahme des Pseudogens *SLC26A10* für multifunktionale Anionenaustauscher und Anionenkanäle codieren [12].

Die Proteinstruktur dieser Transporter besteht aus einem N-terminalen zytoplasmatischen Segment, gefolgt von 10-14 hydrophoben Transmembrandomänen und einer zytoplasmatischen C-terminalen Region [12]. Am C-terminalen Ende befindet sich die, für *SLC26* charakteristische, STAS Domäne [136]. Die STAS (Sulfate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist)-Region ist ein konservierter Genbereich, dem eine Bedeutung bei der Lokalisation des Proteins und bei der Bindung sowie Interaktion mit anderen Proteinen zugeschrieben wird [136]. Mutationen innerhalb dieses Bereiches können mit einem Funktionsverlust und einer fehlerhaften Oberflächenexpression einhergehen, wie Untersuchungen von krankheitsverursachenden Mutationen in der STAS-Domäne von *SLC26A3* zeigen [137, 138]. Außerdem befindet sich am C-terminalen Ende bei den *SLC26*-Transportern mit Ausnahme von *SLC26A1, A2, A5* und *A11* das PDZ-Motiv [14] (Abbildung 5). Es handelt sich um eine Proteininteraktionsstelle, die vermutlich regulatorische Proteine und Transporter wie NHE3 und CFTR binden kann [139]. Eine genauere Proteinstrukturanalyse von *SLC26*-Proteinen wurde bisher nicht durchgeführt [12]. Es wird jedoch angenommen, dass die *SLC26*-Transmembrandomänen als homomere Oligomere angeordnet sind [12]. Dabei ist

umstritten, wie viele Untereinheiten gebildet werden. Während Detro-Dassen et al. eine Dimerstruktur beschreiben, gehen Hallworth und Nichols von einer Tetramerstruktur aus [140, 141]. Die Untereinheiten selbst scheinen die Anionen-Translokationswege zu formen [12, 142]. Außerdem befinden sich innerhalb der Transmembrandomänen zwei Regionen, die eine große Homologie zwischen den SLC26-Transportern aufweisen [14]. Zum einen die Sulfattransporter-Konsens-Signatur (Prosite), die eine Rolle für den Anionentransport zu haben scheint und zum anderen eine hochkonservierte Region am C-terminalen Ende (Saier Motiv) [14] (Abbildung 5). Die Mutationen von *SLC26A2* an den Positionen N425 und L483, die innerhalb dieser Region liegen, können krankheitsverursachend sein [14, 143].

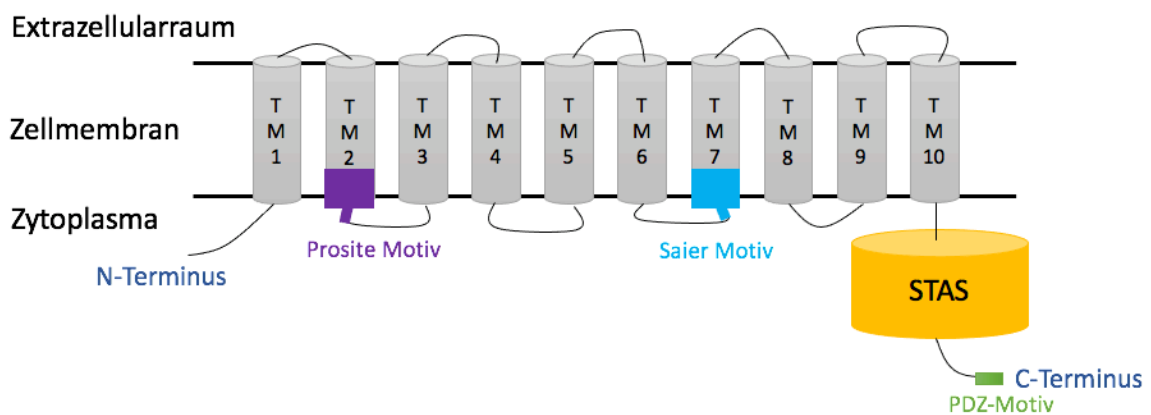


Abbildung 5: Strukturmodell der SLC26-Proteine: Die SLC26-Proteine bestehen aus 10-14 Transmembrandomänen, einer N-terminalen Region und einem C-terminalen Ende. Die beiden Enden liegen im Zytoplasma, genauso wie die am C-terminalen Ende gelegene STAS-Region. Die STAS Region ist charakteristisch für Proteine der SLC26-Genfamilie. Besondere Regionen sind weiterhin das Prosite Motiv (eine Sulfattransporter-Konsens-Signatur), das Saier Motiv (eine hochkonservierte Region) sowie das PDZ Motiv (eine Proteininteraktionsstelle). TM= Transmembrandomäne, STAS= Sulfate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist; modifiziert nach [14]

Die Funktion der SLC26-Proteine ist der multifunktionale Austausch von Anionen [142]. Dabei können Substrate wie  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , Formiat, Sulfat, Oxalat und Glyoxylat von extra- nach intrazellulär oder umgekehrt transportiert werden [12, 142]. *SLC26A7*, *A9* und *A11* können zusätzlich zur Funktion als Anionenaustauscher auch als Anionenkanal fungieren [144-146]. Die SLC26-Proteine unterscheiden sich in ihrer Selektivität für bestimmte Anionen [12]. Während *SLC26A6* beispielsweise fast alle Anionen transportiert, scheint *SLC26A4* spezifisch für den Austausch von monovalenten Anionen zu sein [14]. Diese Selektivität sowie die Transportkapazität wird durch die strukturelle Faltung beeinflusst und kann sich durch Mutationen verändern [147]. Der Austausch kann je nach SLC26-Protein, Substrat und

Zielgewebe elektroneutral oder elektrogen erfolgen [142, 148]. Ebenfalls abhängig vom jeweiligen SLC26-Protein ist das gewebsspezifische Expressionsmuster [14]. So wird SLC26A11 weitverbreitet im Körper exprimiert, SLC26A5 hingegen vor allem im Innenohr [14]. Darüber hinaus wird die Funktion der Anionenaustauscher durch Interaktionen mit anderen Proteinen beeinflusst [148]. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass der  $\text{Cl}^-$  und  $\text{OH}^-/\text{HCO}_3^-$ -Transport von SLC26A3, A4 und A6 durch CFTR aktiviert wird [148].

Der Funktionsverlust von SLC26A2, SLC26A3 und SLC26A4 ist beim Menschen mit angeborenen Erkrankungen assoziiert: Mutationen in *SLC26A2* können verschiedene Arten der Osteochondrodysplasie wie z. B. die Diastrophische Dysplasie hervorrufen, der Ausfall von *SLC26A3* kann eine kongenitale Chlorid diarrhoe verursachen und *SLC26A4*-Mutationen gehen mit dem Pendred-Syndrom oder der isolierten sensorineuralen Schwerhörigkeit (DFNB4) einher [149, 150]. Somit spielen die SLC26-Proteine eine wichtige Rolle in der normalen Entwicklung des Skeletts, der Physiologie des Hörens, der Schilddrüsenhormonbiosynthese sowie der Chlorid- und Bikarbonat-Homöostase beim Menschen. In Studien mit *Slc26*-Knockoutmäusen werden zudem weitere Manifestationen beschrieben. So erkrankten Mäuse ohne funktionsfähiges *Slc26a1* oder *Slc26a6* an einer Urolithiasis und *Slc26a7*-Knockoutmäuse an einer renal-tubulären Azidose [15, 151, 152]. Der Funktionsverlust von *Slc26a5* geht mit einer Schwerhörigkeit einher [153]. Hypochlorhydrie kann durch den Knockout von *Slc26a7* oder *Slc26a9* hervorgerufen werden und das Fehlen von *Slc26a8* führt zur Unfruchtbarkeit der männlichen Mäuse [15, 154, 155]. Eine Übersicht zu den einzelnen *SLC26*-Genen und ihre wichtigsten Eigenschaften mit Ausnahme von *SLC26A7* findet sich im Anhang in Tabelle 14.

### **2.3.2 Struktur und Funktion von SLC26A7**

Das *SLC26A7*-Gen (*SUT2*) ist auf dem Chromosom 8 lokalisiert und codiert für ein 656 Aminosäuren (AS)-langes Protein, das den charakteristischen Aufbau von SLC26-Proteinen widerspiegelt: ein N- und C-terminales zytoplasmatisches Ende, die durch 12 Transmembranomänen voneinander getrennt werden [156-159] (Abbildung 5). Das C-terminale Ende enthält die für die Funktion und Oberflächenexpression wichtige STAS-Region sowie das PDZ- Interaktionsmotiv [10, 158]. Eine große AS-Homologie innerhalb der *SLC*-Genfamilie weist *SLC26A7* zu dem *SLC26A4*-Protein auf und wird wie *SLC26A4* in der Schilddrüse und Niere exprimiert [10]. Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse der *SLC26A7*-RNA Expression aus 27 Gewebeproben von 95 Individuen,

wobei die Expression in der Schilddrüse mit Abstand am stärksten ist [160]. Außerdem kommt *SLC26A7* im Magen, in hochendothelialen Venolen, in der Reissner Membran des Innenohrs, im Auge, in der Zahnschmelzentwicklung und in Nebenhodengängen vor [161-166].

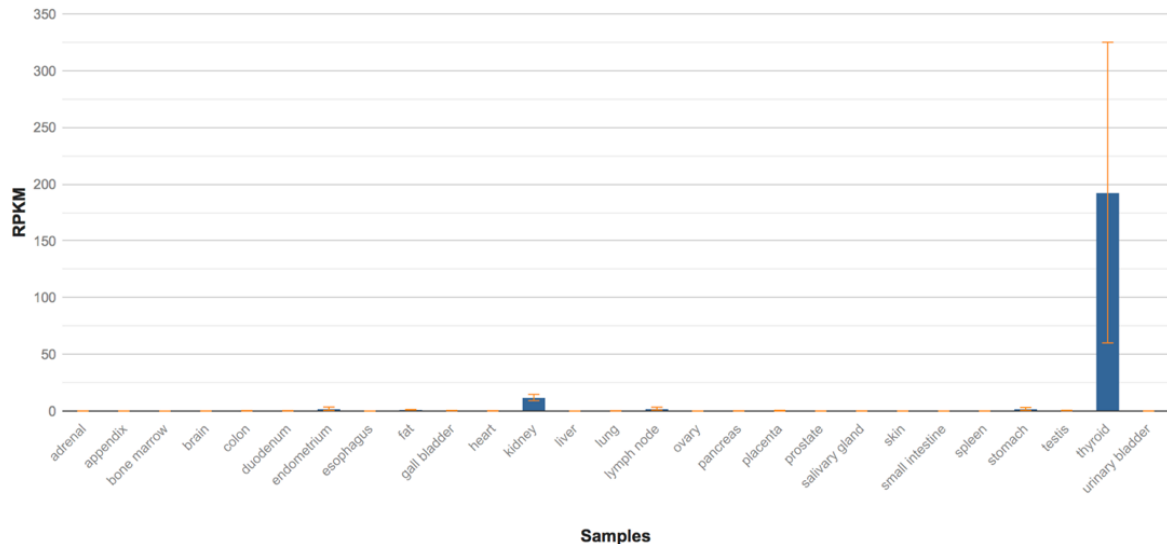


Abbildung 6: *SLC26A7* RNA-Expression in humanem Gewebe: Die Ergebnisse des Sequenzier-Projekts HPA RNA-seq normal tissues geben die RNA-Expression von *SLC26A7* aus 27 Gewebeprobe von 95 Menschen an. *SLC26A7* wird mit RPKM von fast 200 am stärksten in der Schilddrüse exprimiert, gefolgt von der Niere mit einem RPKM von ca.10. RPKM= Reads per kilobase of transcript per Million mapped [160]

Je nach Gewebe kann *SLC26A7* als Anionenaustauscher oder als reiner Anionenkanal fungieren [12]. Am häufigsten wird in der Literatur die Funktion von *SLC26A7* als  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher oder als Anionenkanal mit erhöhter  $\text{Cl}^-$ -Selektivität und geringer  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{OH}^-$ -Permeabilität beschrieben [144, 162, 167]. Die Aktivität des  $\text{Cl}^-$ -Kanals ist dabei sehr empfindlich gegenüber Inhibitoren wie zum Beispiel 4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonsäure (DIDS), Diphenylamin-2-carbonsäure und Glybenclamid und kann durch diese gehemmt werden [144]. Zusätzlich wird seine Aktivität durch den pH-Wert beeinflusst und steigt im sauren Milieu an [144]. Neuere Studien zeigen außerdem eine Funktion von *SLC26A7* als Iodid-Transporter in der Schilddrüse [10, 168].

Da der Knockout von *Slc26a7* in Mäusen zu einer renalen tubulären Azidose sowie einer Veränderung der Magensäureproduktion führt, soll im Folgenden genauer auf die Funktion und Lokalisation von *SLC26A7* im Magen und in der Niere eingegangen werden [15].

### *SLC26A7* im Magen

Im Gastrointestinaltrakt wird *SLC26A7* ausschließlich im Magen und dort vor allem in den Belegzellen exprimiert [162]. Durch Immunfluoreszenzfärbungen konnte die

Lokalisation von SLC26A7 in der basolateralen Membran der Belegzellen nachgewiesen werden [162, 169]. Weitere funktionelle Experimente in Oozyten zeigen, dass SLC26A7 als Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher funktioniert, der sowohl bei basischem als auch bei saurem pH-Wert aktiv ist [162]. Der Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austausch an der basolateralen Membran spielt eine wichtige Rolle bei der Magensäureproduktion, so kann ein gestörter Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austausch die erniedrigte Produktion der Magensäure sowie die Hypochlorhydrie bei *Slc26a27*<sup>-/-</sup> Mäusen erklären [12, 15]. Im Gegensatz dazu gehen Kim et al. viel mehr von einer Funktion als Cl<sup>-</sup>-Kanal aus, der durch Erhöhung der intrazellulären H<sup>+</sup> Ionen an Selektivität zunimmt [164]. Er könnte durch die Aufnahme von Cl<sup>-</sup> direkten Einfluss auf die HCl-Produktion haben [15]. Um die genaue Funktion von SLC26A7 in Belegzellen zu verstehen, bedarf es weiterer Untersuchungen.

#### *SLC26A7 in der Niere*

Der Knockout von *Slc26a7* in Mäusen verursacht auch eine renal-tubuläre Azidose, die sich in einer metabolischen Azidose und alkalischem Urin äußert [15]. Untersuchungen der Expression von SLC26A7 in der Niere zeigen, dass SLC26A7 zum einen in der basolateralen Membran von Schaltzellen Typ A des Sammelrohrs und zum anderen in der subapikalen Region von proximalen Tubuluszellen exprimiert wird [167, 170, 171].

Der Nachweis von SLC26A7 in subapikalen Kompartimenten des proximalen Tubulus wurde bisher nur von Dudas et al. beschrieben, wobei die Funktion nicht untersucht wurde [170]. Es wird vermutet, dass SLC26A7 hier zum Cl<sup>-</sup>-Basenaustausch beiträgt oder als säureaktiver Cl<sup>-</sup>-Kanal für das saure Milieu in subapikalen Endosomen fungiert [170].

Im äußeren medullären Sammelrohr (OMCD) wird SLC26A7 in der basolateralen Membran von Typ-A-Zellen exprimiert, wobei die Oberflächenexpression abhängig vom Kaliumgehalt und der Osmolarität der Umgebung ist [172]. Während SLC26A7 im isotonen Medium eine zytoplasmatische Verteilung aufweist, führt Hyperosmolarität und Hypokaliämie zur Verankerung von SLC26A7 in der Plasmamembran [172]. In der basolateralen Membran wirkt SLC26A7 als Cl<sup>-</sup>-und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher, wie anhand von Untersuchungen in MDCK-Zellen (Madin-Darby-Hundenieren-Zellen) dargelegt werden konnte [173]. Weitere funktionelle Versuche mit diesen Zellen zeigen, dass die Häufigkeit der SLC26A7-Proteine im hyperosmolaren Medium ansteigt und bei sauren pH-Werten abnimmt [173]. In anderen Studien konnte zudem die Zunahme der

Transporteraktivität von *SLC26A7* und ein Anstieg der *SLC26A7*-mRNA um 300% sowie der Protein Expression um das 3,5-fache bei Hyperosmolarität beobachtet werden [167, 171]. Während die Expression für *SLC26A7* in Ratten mit 3-tägigem Wasserentzug anstieg, sank die Expression von AE1 (Anion Exchanger 1) [171]. AE1 ist ein weiterer  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher, der zusammen mit *SLC26A7* in der basolateralen Membran des Sammelrohrs lokalisiert ist und ebenfalls, wenn mutiert, eine renal-tubuläre Azidose verursachen kann [171]. Ein Knockout einer der beiden Kanäle in Mäusen führt zur vermehrten Bildung des anderen [15, 174]. *SLC26A7* spielt neben AE1 im OMCD als  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher eine wichtige Rolle für die Bikarbonat-Rückresorption und die Regulierung des Zellvolumens, insbesondere unter hyperosmolaren Bedingungen. Ein Verlust des Proteins verursacht eine Störung im Säure-Basen-Haushalt und kann bei Mäusen mit einer renalen-tubulären Azidose einhergehen [15].

In Patienten mit defekten *SLC26A7* wurden bisher jedoch keine Veränderungen des Säure-Base-Haushaltes beobachtet [10, 11, 175]. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass *SLC26A7* in der menschlichen Niere eine andere Funktion erfüllen könnte, wie Unterschiede bei der *SLC26A7*-Expression in der Niere zwischen Nagetieren und Menschen vermuten lassen [176]. In der menschlichen Niere wird *SLC26A7* neben der Expression im OMCD auch in den extraglomerulären Mesangiumzellen (EMC) nachgewiesen [176]. Die EMC gehören zum juxtaglomerulären Apparat der Niere, der unter anderem den renalen Elektrolythaushalt reguliert [16].

## 2.4 Die Rolle von *SLC26A7* bei kongenitaler Hypothyreose

Im Gegensatz zu Knockout-Mäusen konnten bei menschlichen Individuen bisher keine Funktionseinschränkungen der Niere, des Magens oder Veränderungen des Säure-Basehaushaltes festgestellt werden [10, 11, 175]. In neuen CH-Screeninganalysen wurden jedoch, mit Hilfe von Whole Exome Sequencing (WES) *SLC26A7*-Veränderungen bei Patienten mit kongenitaler Hypothyreose detektiert und als krankheitsverursachend beschrieben [9-11, 175, 177]. Im Folgenden soll die Rolle von *SLC26A7* bei kongenitaler Hypothyreose untersucht werden, indem zuerst auf die Funktion von *SLC26A7* in der Schilddrüse allgemein eingegangen wird und anschließend bisher beschriebene Patienten mit *SLC26A7*- Mutationen charakterisiert und analysiert werden.

### 2.4.1 *SLC26A7* in der Schilddrüse

*SLC26A7* wird mit Abstand am stärksten in der Schilddrüse exprimiert (siehe Abbildung 6) [160]. Untersuchungen zur genaueren Lokalisation von *SLC26A7* in der Schilddrüse, zeigen widersprüchliche Ergebnisse [10, 11]. Während Ishii et al. mit Hilfe immunhistochemischer Analysen von menschlichem Schilddrüsengewebe sowie Immunfluoreszenz-Analysen von *SLC26A7*-transfizierten MDCK-Zellen eine apikale und laterale Lokalisation in Thyreozyten nachweisen konnten, wird *SLC26A7* in Anti-Flag Immunfärbungen bei *Slc26a7*-FLAG-Mäusen intrazellulär, nahe der basolateralen Membran detektiert [10, 11]. In beiden Untersuchungen zeigt sich jedoch, dass eine Mutation der STAS-Domäne mit einem Verlust der Oberflächenexpression einhergeht [10, 11]. *SLC26A7* kann dann nur noch zytoplasmatisch nachgewiesen werden [10, 11]. Dieses Phänomen ist bereits bei anderen *SLC26*-Genen wie *SLC26A3* und *SLC26A4* beschrieben worden [137, 178]. Weiterhin kommt es durch den Verlust der STAS-Region zu einem Funktionsverlust, wie Ergebnisse elektro- und optophysilogischer Messungen der Mutation p.Gln500Ter zeigen [10].

*SLC26A7* hat in der Schilddrüse eine Funktion als Iodid-Transporter, was durch die große Homologie zwischen *SLC26A4* und *SLC26A7* vermutet wurde und von Ishii et al. bestätigt wurde [10, 11]. Dafür wurde intrazelluläres Iodid nach Zugabe von radioaktivem NaI nach 5 min in *SLC5A5* und *SLC26A7/SLC5A5* transfizierten Nthy-Zellen gemessen und miteinander verglichen [10]. Die *SLC26A7/SLC5A5* transfizierten Zellen wiesen dabei signifikant niedrigere Iodidspiegel auf, was darauf hindeutet, dass Iod nach extrazellulär transportiert wird [10]. Ein weiterer Versuch

wurde mit Hilfe eines Zweikammern Kultursystem mit semipermeabler Membran und MDCK-Zellen statt Nthy-Zellen durchgeführt [10]. Ähnlich wie zuvor wurde radioaktives NaI in die untere Kammer gegeben und nach 45min die Konzentration von Iodid der oberen Kammer bestimmt [10]. Die Iodid Konzentration war bei den *SLC26A7/SLC5A5* transfizierten MDCK-Zellen höher als bei den Zellen, die nur mit *SLC5A5* transfiziert waren [10]. Beide Experimente zeigen, dass *SLC26A7* eine Funktion als Iodid-Transporter hat und die Anionen von intra- nach extrazellulär transportiert werden, was zur Annahme der Lokalisation in der apikalen Membran als weiterer Iodid-Transporter neben *SLC26A4* passen würde [10]. Somit kann sich *SLC26A7* auf die Schilddrüsenhormonbiosynthese auswirken. Cangul et al. konnten keinen durch *SLC26A7* vermittelten Iodid-Ausstrom nachweisen [11]. Sie gehen davon aus, dass *SLC26A7* als pH-regulierender Transporter, die pH-abhängige Enzymaktivitäten wie von *DUOX2* und *TPO* beeinflusst und so Einfluss auf die Hormonbiosynthese haben könnte [11].

Außerdem wurde die Wirkung von TSH auf *SLC26A7* in der Schilddrüse anhand von murinen FRTL5-Zellen untersucht [168]. Durch TSH wurde die mRNA-Expression sowie Aktivität der *SLC26A7*-Promoterregion vermindert, aber die Anreicherung in der Zellmembran gefördert [168]. Ohne TSH-Stimulation wurde *SLC26A7* vermehrt im Zytoplasma detektiert [168]. Somit könnte TSH die Aktivität von *SLC26A7* fördern, indem es für die Verankerung in der Plasmamembran durch beispielweise Phosphorylierung der STAS-Region sorgt, wie bereits für *SLC26A4* und *SLC5A5* beschrieben wurde [168, 178-180].

Ähnlich wie in menschlichem Gewebe ist auch in der Schilddrüse der Maus die mRNA-Expression von *SLC26A7* deutlich erhöht und ein Verlust von *SLC26A7* ist mit einer Hypothyreose assoziiert [11]. Experimente mit *Slc26a7*-Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass die Hypothyreose am 14. Tag nach der Geburt auftritt [11]. Außerdem kam es bei den *Slc26a7*<sup>-/-</sup> Mäusen zur Entwicklung einer Struma, wobei das Gewicht der Schilddrüse am 14. Tag postpartum verglichen mit dem Wildtyp fast doppelt so hoch war [11]. Histologische Untersuchungen zeigten vergrößerte Follikel bei normalen bis hypertrophen Thyreozyten [11, 181]. Insgesamt waren männliche Mäuse stärker von der Hypothyreose betroffen als die weiblichen Tiere [181]. Außerdem wurde kein Unterschied der Schilddrüsenfunktion zwischen Mäusen mit heterozygoten *SLC26A7*-Veränderungen und dem Wildtyp festgestellt [11].

#### 2.4.2 Beschriebene Mutationen in *SLC26A7* bei Patienten

Zou et al., Cangul et al., Ishii et al., Bruellman et al. und Acar et al. haben in fünf voneinander unabhängigen Veröffentlichungen bei 19 Patienten mit angeborener Schilddrüsenhormonbiosynthesestörung Mutationen im *SLC26A7*-Gen als krankheitsverursachend beschrieben [9-11, 175, 177]. In diesen Studien wurden Patienten mit diagnostizierter angeborener Hypothyreose mit Hilfe von WES auf ursächliche Gene untersucht [9-11, 175, 177]. Die Diagnose CH wurde bei den meisten Patienten im Rahmen des Neugeborenencreenings gestellt [10, 11]. Mit Hilfe von bildgebenden Verfahren wie Ultraschall sowie erhöhten TG-Werten im Blut konnte eine Hormonbiosynthesestörung bei vorhandener Schilddrüse nachgewiesen werden [9-11, 175, 177]. Bekannte andere krankheitsverursachende Mutationen wurden ausgeschlossen [9-11, 175, 177].

Die von Zou et al. beschriebenen Schwestern zeigten neben der Mutation im *SLC26A7*-Gen auch eine heterozygote TG-Mutation, c.95G>A, p.R32H [9]. Die ältere Schwester zeigte zusätzlich eine heterozygote Mutation in *SLC26A4*, c.1363A>T, p.I455F [9]. Die beiden heterozygoten Mutationen wurden als Ursache für die CH als unwahrscheinlich erachtet, da die Mutter mit denselben heterozygoten Mutationen in TG und *SLC26A4* keine CH entwickelte [9].

Die Entwicklung einer Struma wurde in 13 von 19 beschriebenen Patienten beobachtet [9-11, 175, 177]. Dabei zeigten sich große Unterschiede bei diesen Patienten in Bezug auf das Strumawachstum und das Therapieansprechen unter L-Thyroxin-Gabe [9-11, 175, 177]. Die phänotypische Variabilität zeigte sich bei den Zou et al. beschriebenen Schwestern sogar innerhalb einer Familie [9].

Bei einem Patienten von Ishii et al. wurde außerdem ein ungewöhnlich hoher TG-Wert von 2600ng/ml gemessen [10]. In den anderen Veröffentlichungen wurden keine genauen Angaben zu gemessenen TG-Werten gemacht.

Die TSH-Werte bei Diagnosestellung waren ähnlich wie das Strumawachstum sehr unterschiedlich (von 6.0mU/l bis >1500mU/l) [11].

Insgesamt wurden in der gnomAD Datenbank bisher 46 krankheitsverursachende Varianten von *SLC26A7* beschrieben, wobei der größte Anteil in der europäischen Bevölkerung detektiert wurde [182]. Eine Analyse bezüglich der Häufigkeit von krankheitsverursachenden *SLC26A7*-Varianten zeigte, dass die durchschnittliche weltweite Trägerfrequenz 0,144% beträgt [182].

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 2 werden die Verbrauchsmaterialien für die experimentellen Methoden 3.2 mit den Hersteller- und Ortsangaben angegeben.

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Name / Hersteller, Ortsangabe</b>
<b>Pipettenspitzen</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 20µl Sapphire Filterspitzen / Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen</li><li>• 200µl Pipettenspitzen / Sarstedt, Nümbrecht</li><li>• 1000µl Pipettenspitzen / Sarstedt, Nümbrecht</li></ul>
<b>Reagiergefäße</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 2ml Reagiergefäße / Sarstedt, Nümbrecht</li><li>• 1,5ml Reagiergefäße / Sarstedt, Nümbrecht</li><li>• 0,2ml Quali PCR Tube Streifen G003-A / Kisker Biotech GmbH &amp; Co. KG, Steinfurt</li><li>• 0,2ml PCR SoftTubes / Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf</li></ul>

Tabelle 2: Die verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Namen- und Herstellerangaben

##### 3.1.2 Geräte

Die Geräte für die experimentellen Methoden 3.2 zur Untersuchung des *SLC26A7* Gens sind in Tabelle 3 aufgelistet.

<b>Gerät</b>	<b>Name / Hersteller, Ortsangabe</b>
<b>Spectrophotometer</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Nano Drop 2000 / Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA</li></ul>
<b>Reagenzglasschüttler</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• SLG Vortexer, Charley 2 / Süd Laborbedarf GmbH, Gauting</li></ul>

<p style="text-align: center;"><b>Zentrifugen</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Universal High Speed Centrifuge Z 323 K / Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen</li> <li>• Rotanta 450 R / Hettich, Tuttlingen</li> <li>• Centrifuge 5415 D / Eppendorf, Hamburg</li> <li>• Mini Centrifuge C-1200 / National Labnet Co., Woodbridge NJ, USA</li> <li>• Sprout Mini Centifuge / Heathrow Scientific, Illinois, USA</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Thermozykler</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GeneAmp PCR System 9700 / Applied Biosystems, Waltham USA</li> <li>• 2720 Thermo Cycler / Applied Biosystems, Waltham USA</li> <li>• Thermo Scientific Arktik Thermocycler / Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA</li> <li>• GeneTouch Thermal Cycler / Bioer, Hangzhou, China</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Waagen</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Europe 1000 / Gibertini Elettronica SRL, Mailand, Italien</li> <li>• LC 4200 / Satorius, Göttingen</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Mikrowelle</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MW 7869, 900 Watt mit Grillfunktion / Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern (Sauerland)</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Spannungsgeber</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Consort E835 / Consort bvba, Turnhout, Belgien</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Elektrophoresesystem</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PerfectBlue Gel System Mini L, Modell 40-1214 / PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>LED Lichterkammer</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agarose-Gel Imaging System / Nippon Genetics, Dueren</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Heizblock</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mixing Block MB-102 / Bioer, Hangzhou, China</li> </ul>

<b>Sequenzier</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3130 Avant Genetic Analyzer / Applied Biosystems, Waltham USA</li> </ul>
<b>Pipetten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Finnpipette (0,5 -10 µl, 5 – 40 µl, 40 – 200 µl, 200 – 1000 µl) / Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA</li> <li>• Research Plus 10, 100, 200, 1000 / Eppendorf, Hamburg</li> </ul>

Tabelle 3: Die verwendeten Geräte mit Namen- und Herstellerangaben

### 3.1.3 Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 4 mit Hersteller- und Ortsangabe den entsprechenden Labormethoden zugeordnet.

<b>Labormethoden</b>	<b>Reagenzname / Hersteller, Ortsangabe</b>
<b>PCR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>10x Reaktionspuffer BD</b> / Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern</li> <li>• <b>Magnesiumchlorid [25mM]</b> / Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern</li> <li>• <b>HPLC- H<sub>2</sub>O</b> / Merck, Weiterstadt</li> <li>• <b>dNTP's [1,25mM]</b> / Promega, Madison, USA</li> <li>• <b>Betain [5M]</b> / Sigma-Aldrich, St. Louis, USA</li> <li>• <b>Taq DNA Polymerase I [5U/µl]</b> / Roche, Mannheim</li> </ul>
<b>Gelelektrophorese</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Agarose Basic</b> / AppliChem, Darmstadt</li> <li>• <b>TBE-Puffer</b> (siehe Tabelle 5)</li> <li>• <b>Midori Green Advance DNA Stain</b> / Nippon Genetics Europe GmbH, Düren</li> <li>• <b>DNA-Ladepuffer</b> (siehe Tabelle 5)</li> <li>• <b>100 BP Ladder</b> /New England BioLabs Inc., Ipswich, USA</li> </ul>
<b>PCR Produkt Aufreinigung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Exonuclease I [20000 U/ml]</b> / New England BioLabs Inc., Ipswich, USA</li> <li>• <b>Shrimp Alkaline Phosphatase [1000U/ml]</b> / New England BioLabs Inc., Ipswich, USA</li> <li>• <b>HPLC- H<sub>2</sub>O</b> / Merck, Weiterstadt</li> </ul>

<b>Sequenzierung nach Sanger</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>5x Sequenzierungspuffer</b> / Starseq, Mainz</li> <li>• <b>BigDye Terminator v.3.1</b> / Starseq, Mainz</li> <li>• <b>HPLC- H<sub>2</sub>O</b> / Merck, Weiterstadt</li> </ul>
<b>Fällung der Sequenzprodukte</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>100% Ethanol</b> / Honeywell Riedel-de-Haen, Seelze</li> <li>• <b>70% Ethanol</b> (siehe Tabelle 5)</li> <li>• <b>Natriumacetat, pH 5.2 [3M]</b> (siehe Tabelle 5)</li> <li>• <b>HPLC- H<sub>2</sub>O</b> / Merck, Weiterstadt</li> <li>• <b>Hi-Di™ Formamide</b> / Applied Biosystems, Darmstadt</li> </ul>

Tabelle 4: Die verwendeten Reagenzien mit Namen- und Herstellerangaben

### 3.1.4 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind mit den dazu benötigten Reagenzien in Tabelle 5 angegeben.

Lösungen, Puffer	Reagenzien	Hersteller, Ortsangabe
<b>1x TE Puffer</b>	Tris Base [10mM] EDTA [1mM] → In 1l H <sub>2</sub> O lösen, pH 8,0 → Lösung autoklavieren	Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe
<b>10 x TBE</b>	Tris Base [90mM] Borsäure [90mM] EDTA [1,25mM] → In 1l H <sub>2</sub> O lösen, pH 8,3 → Lösung autoklavieren	Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe
<b>DNA- Ladepuffer</b>	0,175g Orange G 15g Sucrose → In 50ml H <sub>2</sub> O lösen → sterilfiltrieren	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA BioRad, Hercules, USA
<b>3M Natriumacetat</b>	Natriumacetat [82,03M] → In 250ml H <sub>2</sub> O lösen	Roth, Karlsruhe

	<p>→ mit Essigsäure titrieren auf pH 5,2</p> <p>→ mit 500ml H<sub>2</sub>O auffüllen</p>	
--	--	--

Tabelle 5: Die verwendeten Puffer und Lösungen und ihre Reagenzien

### 3.1.5 Primer

Die Primer, die für die PCR und Sequenzierung anhand der genomischen Sequenz *ENST00000523719.5* von *Ensembl* erstellt wurden, wurden von der Firma metabion international AG, Planegg synthetisiert. In Tabelle 6 sind die Primersequenzen für jedes Exon mit der jeweiligen experimentell ermittelten Annealing Temperatur aufgelistet.

Exon	Primernamen	Primersequenzen	Annealing Temperatur
Ex. 1	1F 1R	5'-GGAGAAGCACTTGAAGCC-3' 5'-GAATTGGTGTACAAGACAGAC-3'	58°C
Ex. 2	2F 2R	5'-GTCAGGTTTCATGTAGATTC-3' 5'-CTCTTAATACTCACCTAG-3'	54°C
Ex. 3	3F 3R	5'-GACCAACTTAACACTGAACC-3' 5'-GTAGGCAACTATATCCATAAG-3'	58°C
Ex. 4	4F 4R	5'-GTAGACATCTCTGCAATC-3' 5'-GCAATTACCTTGGCTACAC-3'	58°C
Ex. 5	5F 5R	5'-CACAGAGGAGGGGACAGTG-3' 5'-CCTAGTCACTGTGTGGACAC-3'	58°C
Ex. 6	6F 6R	5'-GAACCTAACAATGTGCTCAG-3' 5'-GCATACCTTAAGTCACACTC-3'	58°C
Ex. 7	7F 7R	5'-GATGAAGCCAGAAGAGTC-3' 5'-GCTGAGGGTTACTACAGAC-3'	58°C
Ex. 8	8F 8R	5'-CACTCCTGTATCCTGTAG-3' 5'-GTAAGAGGTGAAGTCTAGG-3'	58°C
Ex. 9	9F 9R	5'-CTGTCGAGTCAGAGTTTCTG-3' 5'-GTGAACAATCAATGTCAGG-3'	58°C
Ex. 10	10F 10R	5'-CTTGCTCATTGTAAGCACC-3' 5'-CACCCTAGAGGGAGCTTTG-3'	58°C

Ex. 11	11F 11R	5'-CAGTTTGTCTGCTGTCAC-3' 5'-GTGGTAGCTTTCCACACCTC-3'	58°C
Ex. 12	12F 12R	5'-GTTTCGCTTTTCAAGAGAG-3' 5'-GTACAAGTCTCAAATGAC-3'	58°C
Ex. 13	13F 13R	5'-CTGAGAGTCTGATGGAGC-3' 5'-GTAGTACTATATGTTACAG-3'	54°C
Ex. 14	14F 14R	5'-GCCTCTGTTGTTAACCTC-3' 5'-CACATATGTACCACTGGAAG-3'	58°C
Ex. 15	15F 15R	5'-GTCTAGGCTACTGCCTCCTG-3' 5'-GTGCTGTAGTACCTGCAAC-3'	58°C
Ex. 16	16F 16R	5'-CTGAAAAGAATGCTAGTG-3' 5'-GAGTAGAGGGAAGAGGAC-3'	54°C
Ex. 17	17F 17R	5'-CACCTGAAATTGCATTCC-3' 5'-GAAGCTGAATAGGATCTC-3'	58°C
Ex. 18/Ex.19	18F 18R	5'-CTCTGGTGGTTTACTTC-3' 5'-CCAATCCTCAGAGCGGTG-3'	58°C
Ex. 20	19F 19R	5'-CTGGTTGCAGAGTCAGCAG-3' 5'-CAACTTACAGCACAATAG-3'	56°C
	20F 20R	5'-CTTTTTGGTTGTTTAGATCC-3' 5'-CCAACAAAGCTTCAGTGG-3'	58°C

Tabelle 6: Die verwendeten Primersequenzen für *SLC26A7*. F=Forward, R=Reverse

### 3.1.6 Patienten

Insgesamt wurden 20 Patienten ausgewählt und auf Veränderungen im *SLC26A7*-Gen untersucht. Bei 16 Kandidaten wurden vorab genetische Untersuchungen in den bisher bekannten Kandidatengen durchgeführt. 4 Patienten wurden nur anhand ihres Phänotyps prospektiv ausgewählt. Ein Überblick über die Ergebnisse der Gendiagnostik und zu den klinischen Merkmalen, Geschlecht, Struma-Entwicklung und Laborparameter der einzelnen Patienten geben die Tabelle 7 und Tabelle 8.

Patienten-Nr.	Heterozygote TG-Mutation	Heterozygote Mutation in Kandidatengen	Unklare Variante
Patient 1	X		<i>TPO, TG</i>
Patient 2	X		<i>PDS</i>

<b>Patient 3</b>			
<b>Patient 4</b>			
<b>Patient 5</b>		<i>DUOX2</i>	
<b>Patient 6</b>			
<b>Patient 7</b>		<i>DUOX2</i>	
<b>Patient 8</b>			
<b>Patient 9</b>	X		
<b>Patient 10</b>		<i>DEHAL1</i>	
<b>Patient 11</b>	X	<i>DUOX2</i>	<i>TPO</i>
<b>Patient 12</b>			
<b>Patient 13</b>			
<b>Patient 14</b>	X	<i>DUOX2</i>	
<b>Patient 15</b>			
<b>Patient 16</b>			
<b>Patient 17</b>	prospektiv ausgewählt		
<b>Patient 18</b>	prospektiv ausgewählt		
<b>Patient 19</b>	prospektiv ausgewählt		
<b>Patient 20</b>	prospektiv ausgewählt		

Tabelle 7: Ergebnisse der genetischen Voruntersuchungen der ausgewählten Patienten in den Kandidatengenen für CH. X= vorhanden, TG= Thyreoglobulin, TPO= Thyreoperoxidase, PDS= Pendrin (PDS), DUOX2= Dualoxidase 2, DEHAL1= Iodotyrosin-Dehalogenase 1

<b>Patienten-Nr.</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Struma</b>	<b>TSH-Wert (mU/l)*</b>	<b>TG-Wert (ng/ml)</b>
<b>Patient 1</b>	männlich	X	k.A.	k.A.
<b>Patient 2</b>	männlich		72	40
<b>Patient 3</b>	weiblich	X	704	>3000
<b>Patient 4</b>	weiblich	X	270	>300
<b>Patient 5</b>	weiblich	X	41	k.A.

<b>Patient 6</b>	weiblich	X	383	372
<b>Patient 7</b>	weiblich		299	100
<b>Patient 8</b>	männlich		111	k.A.
<b>Patient 9</b>	weiblich		135	120
<b>Patient 10</b>	weiblich		87	>300
<b>Patient 11</b>	männlich		k.A.	k.A.
<b>Patient 12</b>	männlich	X	73	2400
<b>Patient 13</b>	männlich		k.A.	113
<b>Patient 14</b>	weiblich		321~	k.A.
<b>Patient 15</b>	weiblich		149	63
<b>Patient 16</b>	weiblich		135	15
<b>Patient 17</b>	weiblich	X	k.A.	5
<b>Patient 18</b>	männlich	X	>250	k.A.
<b>Patient 19</b>	männlich	X	202	NB
<b>Patient 20</b>	weiblich	X	k.A.	↑↑

Tabelle 8: Die klinischen Merkmale Geschlecht, Struma, TSH-Wert und TG-Wert der ausgewählten Patienten.  
 \*TSH-Wert im Neugeborenen Screening, ~Neugeborenen Screening war unauffällig, im Alter von 2 Monaten gemessener TSH-Wert. X= vorhanden, k.A.= keine Angaben, ↑↑= erhöht, NB= Normbereich

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Auswahl der Patienten

Aus einem Patientenkollektiv, das im Rahmen diagnostischer Abklärung von Schilddrüsenerkrankungen im Labor der AG [REDACTED] für Molekulare Endokrinologie, Universitätsmedizin Mainz untersucht wurde, und bei denen eine Einwilligungserklärung nach dem Gendiagnostikgesetz zur molekulargenetischen Untersuchung vorlag, wurden 20 Patienten ausgewählt (Abbildung 7). Die Auswahlkriterien basieren auf den unter 2.4.2 aufgeführten klinischen Phänotypen der Patienten mit in der Literatur beschriebenen *SLC26A7*-Mutationen [9-11, 175, 177].

Eingeschlossen für die Untersuchung des *SLC26A7*-Gens wurden nur Patienten mit einer Hypothyreose auf Grund einer **Hormonbiosynthesestörung**.

Im nächsten Schritt wurden anhand **genetischer Voruntersuchungen** Patienten mit homozygoten oder compound-heterozygoten Mutationen in einem der bisher bekannten Kandidatengenen ausgeschlossen. Patienten ohne Mutationen und mit heterozygoten Mutationen in einem oder zwei unterschiedlichen Kandidatengenen, die nicht als ursächlich für die Erkrankung zu betrachten sind, wurden hingegen eingeschlossen.

Bei dieser Patientengruppe wurde zudem das **klinische Profil** analysiert. Ausgewertet wurden dazu: Arztbriefe, Überweisungen, Laborparameter, Bildgebung und Therapieverläufe, soweit vorhanden. Ausgeschlossen wurden hierbei Patienten mit Tumorleiden, syndromalen Erkrankungen wie Trisomie 21 und Pendred-Syndrom, sowie Patienten, die erst im Verlauf eine Hypothyreose entwickelten und diese nicht bereits im Säuglingsalter aufgetreten war.

Aus den 665 Patienten wurden so insgesamt 16 Kandidaten ausgewählt. 4 weitere Patienten wurden prospektiv, nur anhand ihres klinischen Profils (CH mit Hormonbiosynthesestörung und Struma) eingeschlossen.

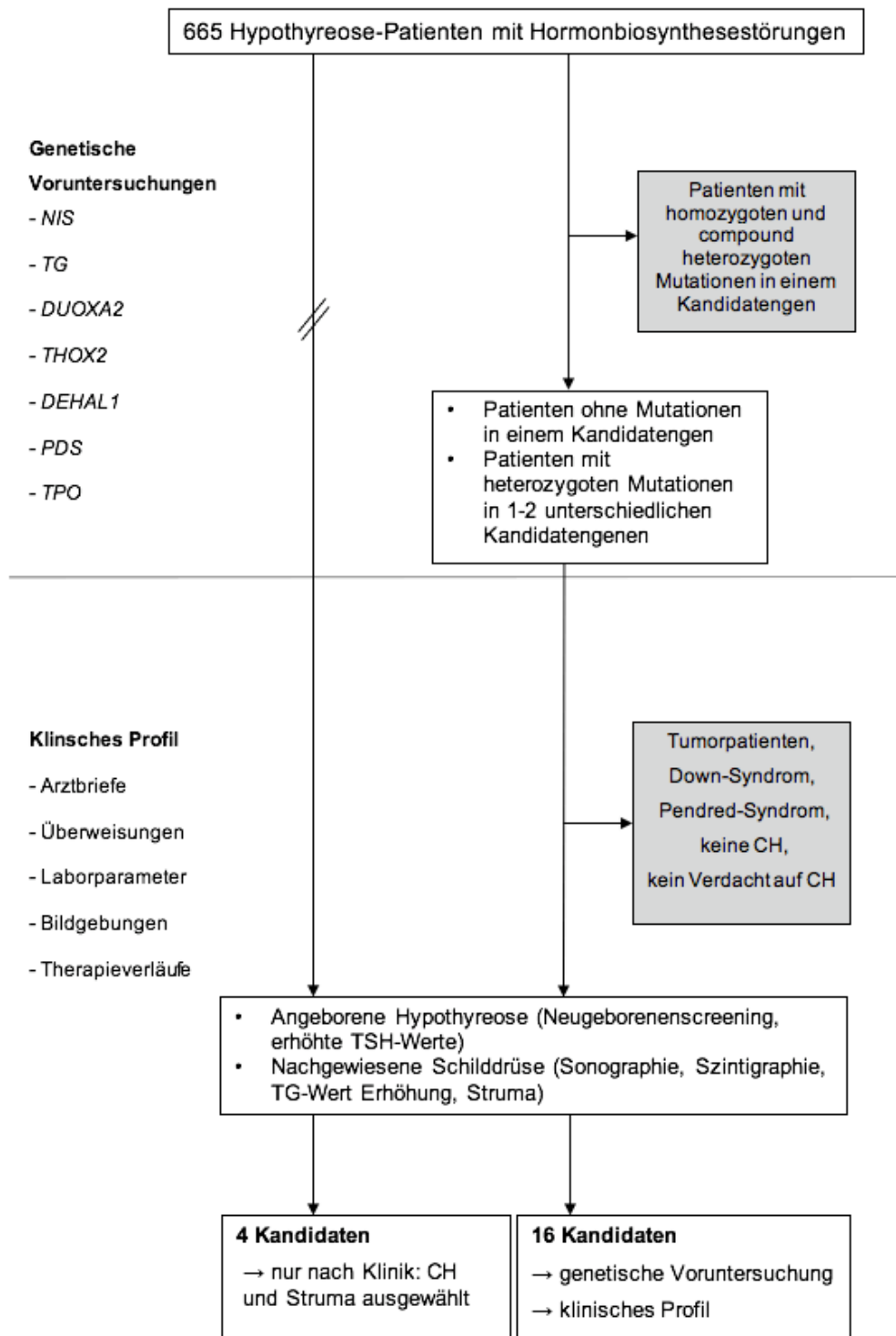


Abbildung 7: Schema zur Patientenauswahl: Aus 666 Patienten mit Hypothyreose auf Grund einer Hormonbiosynthesestörung, die im Labor der AG ..... für Molekulare Endokrinologie auf ursächliche Mutationen in den bisherigen Kandidatengenen untersucht wurden und bei denen eine Einwilligungserklärung nach dem Gendiagnostikgesetz vorlag, wurden Patienten ohne und mit heterozygoten Mutationen in ein bis zwei unterschiedlichen Kandidatengenen eingeschlossen. Ausgeschlossen wurden Patienten mit homozygoten und compound heterozygoten Mutationen in diesen Genen. Im nächsten Schritt wurden die Patienten nach dem klinischen Profil analysiert. Dabei wurden 16 Patienten ausgewählt, bei denen eine angeborene Hypothyreose bei nachgewiesener Schilddrüse vorlag. 4 Patienten wurden nur auf Grund des klinischen Bild eingeschlossen. Nicht weiter untersucht wurden Patienten mit Tumoren, Down-Syndrom, Pendred-Syndrom, ohne angeborene Hypothyreose und ohne Verdacht auf angeborene Hypothyreose. Insgesamt wurden 20 Kandidaten ausgewählt. CH = Kongenitale Hypothyreose, NIS = Natrium-Iodid-Symporter, TG = Thyreoglobulin, DUOXA2 = Dual Oxidase Maturation Factor 2, THOX2 = Dual Oxidase, DEHAL1 = Iodotyrosin-Dehalogenase 1, PDS = Pendrin, TPO = Thyreoperoxidase, grau: Ausschlusskriterium, weiß: Einschlusskriterium

### 3.2.2 **Polymerase-Kettenreaktion**

Zur Amplifizierung der Exons von *SLC26A7* wurde für die PCR-Reaktion ein Mastermix aus 2,5µl 10x PCR Puffer, 1,5µl MgCl<sub>2</sub> (c=15mM), 11,75µl HPLC H<sub>2</sub>O, 2µl dNTPs/Desoxyribonukleosid-Triphosphate (c=1,25mM), 3µl Betain (c=5M) und 0,25µl *Taq Polymerase* (c=5 U/µl) angesetzt. Zusätzlich wurden jeweils 1µl forward- und reverse Primer (c=10µM) und 2µl Template DNA (c=10ng/µl) hinzu pipettiert. Alle oben genannten Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Bei den Exonen 2 und 13 wurde anstelle der 3µl Betain zusätzlich 3µl HPLC H<sub>2</sub>O verwendet.

Für die *Polymerase-Kettenreaktion* (PCR) wurde die DNA zu Beginn bei 94°C 1 min denaturiert. Darauf folgten 40 Zyklen bestehend aus 3 Schritten, je 1 min: Denaturierung der DNA bei 94°C, Annealing bei 54-58°C (siehe Tabelle 9) und Elongation bei 72°C. Nach abschließender Elongation für 10 min bei 72°C wurde das PCR-Produkt bis zum nächsten Schritt bei -20°C eingefroren.

### 3.2.3 **Agarosegelelektrophorese**

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurde das Ergebnis der PCR überprüft. Für die Herstellung des 1%igen Agarosegels wurde 1g Agarose durch Erhitzen in 100ml 1xTBE-Puffer aufgelöst und anschließend auf 60-70°C abgekühlt, um 3µl Midori Green Advance DNA Farbstoff zum Anfärben der PCR-Produkte hinzugegeben. Das Gemisch wurde auf einem Gelträger mit einem Kamm für 20-25 Taschen verteilt und danach 25 min bei Raumtemperatur polymerisiert. Für die Gelelektrophorese wurden anschließend jeweils 5µl PCR-Produkt (3.2.2) mit 5µl Orange Ladepuffer (3.1.4) vermischt und in die Taschen des Gels aufgetragen. Als Größenstandard wurde ein 100bp-Marker verwendet. Die PCR-Produkte wurden bei 130V Spannung in 1xTBE Elektrolyseepuffer der Größe nach aufgetrennt und anschließend unter blauem LED-Licht sichtbar gemacht. Die PCR-Produkte wurden weiterverwendet, wenn sich eindeutige Banden in einer plausiblen Größe abzeichneten und die negative Kontrolle keine Bande anzeigte.

### 3.2.4 **Exonuclease-Phosphatase-Verdau**

Die PCR-Produkte (3.2.2) wurden durch die *Shrimp Alkalische Phosphatase* (SAP) und die *Exonuclease I* enzymatisch aufgereinigt, wodurch einzelsträngige DNA wie Primer und Phosphatreste von nicht eingebauten dNTPs verdaut werden. Hierfür wurden zu 20µl PCR-Produkt 0,2µl *Exonuclease I* (c=20 U/µl) und 0,8µl SAP (c=1 U/µl) hinzu pipettiert und mit 3µl HPLC H<sub>2</sub>O auf ein 24µl Reaktionsvolumen aufgefüllt.

Das Reaktionsgemisch wurde für 30min bei 37°C inkubiert. Nach dem enzymatischen Verdau wurden die Enzyme für 15min bei 85°C inaktiviert und bis zum nächsten Schritt der Sequenzierung bei -20°C gelagert.

### **3.2.5 Sequenzierungsreaktion nach Sanger**

Die Sequenzierung der SAP-aufgereinigten PCR-Produkte wurde nach der Kettenabbruchsmethode von Sanger durchgeführt. Hierzu wurde ein Mastermix aus 1µl 5x Sequenzierungspuffer, 1µl BigDye Terminator v.3.1. Sequenzierungspremix und 4µl HPLC H<sub>2</sub>O, 5µl aufgereinigtes PCR-Produkt (3.2.4) und 1µl des entsprechenden Sequenzierprimers (c=5µM) (Tabelle 9) je Reaktion hinzu pipettiert. Alle oben genannten Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Für die Sequenzierungsreaktion wurde die DNA zu Beginn bei 96°C für 1 min denaturiert. Anschließend wurden 25 Zyklen durchlaufen, bestehend aus 2 Schritten: Denaturierung der DNA für 10s bei 96°C, Annealing und Elongation für 4min bei 60°C. Bei PCR-Proben, die bei der Annealingtemperatur 54°C amplifiziert wurden, wurde ein zusätzlicher Annealingschritt für 5s bei 50°C durchgeführt. Falls die Probe nicht direkt weiterverarbeitet wurde, erfolgte eine Lagerung bei -20°C.

### **3.2.6 Fällung der Sequenzreaktion und elektrophoretische Auftrennung**

Um Störungen bei der elektrophoretischen Auftrennung der Sequenzen durch überschüssige Didesoxynukleotide zu verhindern, wurde eine Alkoholfällung durchgeführt. Hierfür wurden 12µl der Sequenzreaktion (3.2.5) mit 2µl 3M Natriumacetat (pH=5,2), 55µl 100% Ethanol und 8µl HPLC H<sub>2</sub>O, in einem 1,5ml Reaktionsgefäß gut vermischt. Anschließend wurden die Proben bei 4°C und 13365 x g 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert. Durch Hinzugeben von 400µl 70% Ethanol und erneuter 30-minütiger Zentrifugation bei 18°C und 13365 x g wurden die Natrium-Salzreste rausgewaschen. Nachdem der Überstand vorsichtig dekantiert wurde, wurde das DNA-Pellet 10 min bei 70°C getrocknet. Das gefällte Sequenzierungsprodukt wurde jeweils in 15µl deionisiertem Formamid gelöst und elektrophoretisch aufgetrennt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit Hilfe der Kapillarelektrophorese im 3130 Avant Genetic Analyzer.

### **3.2.7 Auswertung der Sequenzen**

Für die Auswertung wurden die Sequenzen mit Hilfe des Computerprogramm Sequencher 5.1 von Gene Codes (Ann Arbor, USA) graphisch als

Elektropherogramme dargestellt. Die Sequenzen wurden mit der Wildtypsequenz *ENST00000523719.5* von *Ensembl* [159] verglichen und ausgewertet.

### 3.2.8 *in silico*-Analysen

Abweichungen der Sequenzen von der Wildtypsequenz *ENST00000523719.5* wurden mit Hilfe von *in silico*-Analysen bewertet.

Zur Unterscheidung von Polymorphismen und Mutationen wurden Variants of unknown significance (VUS) mit Hilfe von den Datenbanken *dbSNP* [183], *gnomAD* [184] und *Exome Variant Server* [185] charakterisiert.

Mutationsanalysen von Varianten mit einer MAF (Minor Allele Frequency) < 0,001% und Veränderungen, die in den Datenbanken bisher nicht hinterlegt worden sind, wurden mit dem *in silico* Programm *Mutation Taster* auf ihr krankheitsverursachendes Potential untersucht (vgl. 5.4, 5.5) [186]. Das Programm analysiert die Varianten unter Berücksichtigung von regulatorischen Domänen, phylogenetischen Eigenschaften mit Hilfe des phyloP/phastCons Score, mRNA Splicing und vergleicht die Veränderung mit bereits beschriebenen Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP), den Daten aus dem 1000-Genome-Projekt sowie mit Informationen über krankheitsverursachende Varianten aus ClinVar-NCBI und der Human Gene Mutation Database (HGMD) [187]. Der Vorteil von *Mutation Taster* gegenüber den bekannten *in silico*-Programmen *SIFT* und *Polyphen* ist, dass auch Intronbereiche und Veränderungen mehrerer Basen untersucht werden können [187].

Die Spleißanalysen (Kapitel 5.4, 5.5) wurden mit den Programmen *ESEfinder* und *SpliceAID* durchgeführt [188, 189]. *ESEfinder* untersucht die Sequenz auf mögliche Exonic Splice Enhancer und mögliche Spleißstellen sowie Bindungsstellen für SRproteine [188]. Beide sind wichtig für den Prozess des alternativen Spleißens und somit für die Herstellung der mRNA [190]. Veränderungen im Spleißen können zu unterschiedlichen Protein-Isoformen führen, die mit einer abweichenden, sogar krankheitsverursachenden Funktion einhergehen können. Das Programm *SpliceAID* untersucht ebenfalls die Sequenz auf Bindungsstellen für Proteine, die an die prä-mRNA binden und das Spleißen beeinflussen [191]. Während *ESEfinder* nur Bindungsstellen für SRProtein berücksichtigt, wird bei *SpliceAID* eine größere Vielzahl an Proteinbindungsstellen analysiert [190-192]. Trotz dieser Vorhersageprogramme muss die Auswirkung durch Mutationen und Varianten auf das Spleißen immer experimentell nachgewiesen werden und kann nicht ausschließlich anhand von *in silico*-Analysen festgemacht werden.

Um Veränderungen des Proteins graphisch darstellen zu können, wurde das Programm *SWISS-Model* verwendet (vgl. 5.4, 5.5) [193]. *SWISS-Model* konfiguriert hierfür eine noch nicht erfasste Proteinstruktur anhand von erfassten homologen 3D-Proteinmodellen [194].

Zusätzlich wurden Analysen zu Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe von *STRING* durchgeführt [195]. In der Datenbank *STRING* werden sowohl bekannte als auch vorhergesagte Protein-Protein-Interaktionen angezeigt (Kapitel 5.4) [196]. Das angezeigte Netzwerk umfasst sowohl physikalische als auch funktionelle Interaktionen [196]. Die Analysen basieren hauptsächlich auf dem Wissen der Datenbanken, Ko-Expressionsanalysen, Vorhersagen bezüglich des genomischen Kontexts, Laborexperimente und Textmining, der Analyse von Textdaten [196].

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Patientenkollektiv**

Für die Untersuchung des *SLC26A7*-Gens wurden 20 Patienten anhand klinischer und genetischer Charakteristika wie in 3.2.1 beschrieben ausgewählt. Bei allen Patienten wurde eine angeborene Hypothyreose diagnostiziert. Bei 16 Patienten wurden keine ursächlichen Mutationen in den bisher bekannten Kandidatengenen für Schilddrüsenhormonbiosynthesestörungen *PDS*, *TPO*, *THOX2*, *NIS*, *TG*, *DUOXA2*, *DEHAL1* detektiert. Weitere 4 Patienten wurden nur anhand ihrer Klinik (CH und Struma) eingeschlossen. In Abschnitt 3.1.6 werden die Charakteristika Geschlecht, Struma und heterozygote Mutationen in Kandidatengenen zu den jeweiligen Patienten aufgelistet.

#### **4.1.1 Auswahlkriterien**

Aufgrund der unter 3.2.1 dargestellten Auswahl der untersuchten Patienten erscheint folgendes Vorgehen für die Praxis geeignet:

Patienten mit CH und nachgewiesener Schilddrüse (z.B. mittels Sonographie, Szintigraphie, messbares TG), bei denen Tumorerkrankungen, Down-Syndrom und Pendred-Syndrom ausgeschlossen werden können und für die keine homozygote oder compound heterozygote Mutation in einem bekannten Kandidatengen nachgewiesen werden konnte, sollten in jedem Fall auf eine *SLC26A7* Mutation untersucht werden.

Anhand der rein klinischen Auswahlkriterien CH in Kombination mit einer vergrößert nachgewiesenen Schilddrüse (Struma) wurde bei einem von vier auf diese Weise prospektiv ausgewählten Patienten eine bisher nicht beschriebene Veränderung in *SLC26A7* detektiert, sodass eine Aufnahme der Untersuchung von *SLC26A7* in die Routinediagnostik von CH aufgrund einer Hormonbiosynthesestörung sinnvoll erscheint.

## **4.2 Etablierung der Methoden**

### **4.2.1 Generieren der Primersequenzen**

Für die Primersequenzen wurde die genomische Sequenz *ENST00000523719.5* von *Ensembl* verwendet [159]. *SLC26A7-ENST00000523719.5* besteht aus 20 Exonen und kodiert für ein Protein mit 656 Aminosäuren. Bei der Datenbankrecherche via *Ensembl* finden sich für *SLC26A7* viele Polymorphismen [159]. Die Häufigkeit der beschriebenen Polymorphismen in den Primersequenzen wurde in den Datenbanken

*TOPMed* und *gnomAD* überprüft und beträgt höchstens  $<0.001$ . Mit Hilfe von *Blast* wurden die erstellten Primer auf Spezifität (Query Cover) getestet.

Alle Primersequenzen entsprechen einer Länge von ca. 20bp, sodass PCR-Produkte von 340bp-850bp entstehen. Insgesamt wurden 40 Primersequenzen erstellt. Mit Ausnahme von Exon 18-20, wurde für jedes Exon ein forward- und ein reverse-Primer etabliert. Exon 18 und Exon 19 haben wegen ihrer kurzen Länge und des kleinen Introns einen gemeinsamen forward- und reverse-Primer, für Exon 20 wurden aufgrund der Exonlänge von 695bp zwei forward- und reverse-Primer benötigt, um das Exon 20 in zwei überlappenden Fragmenten für die Mutationssuche zu amplifizieren. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 6 aufgelistet.

#### **4.2.2 Etablierung der PCR-Bedingungen**

Die PCR-Bedingungen für *SLC26A7* wurden mit DNA von Kontrollpatienten etabliert. Durch Variieren der Betain-Konzentration (0-5M) und der Annealing Temperaturen (54-58°C) konnte ein geeignetes PCR-Protokoll für *SLC26A7* erstellt werden (siehe Tabelle 9). Bis auf Exon 2, 13, 16 und 20 (Primer 19) wurden die PCR-Produkte mit Zugabe von 5M Betain und bei der Annealing Temperatur von 58°C, wie in 3.2.2 beschrieben, generiert.

Exon	Primer	PCR-Prod. (10pm)	Annealing	Zusätze	Sequenz.primer (5pM)
Ex. 1	1F 1R	1F/1R 346bp	58°C	1 M Betain	1R
Ex. 2	2F 2R	2F/2R 744 bp	54°C	/	2F
Ex. 3	3F 3R	3F/3R 848 bp	58°C	1 M Betain	3R
Ex. 4	4F 4R	4F/4R 555 bp	58°C	1 M Betain	4R
Ex. 5	5F 5R	5F/5R 629 bp	58°C	1 M Betain	5R
Ex. 6	6F 6R	6F/6R 502bp	58°C	1 M Betain	6R
Ex. 7	7F 7R	7F/7R 525 bp	58°C	1 M Betain	7F
Ex. 8	8F 8R	8F/8R 569 bp	58°C	1 M Betain	8F
Ex. 9	9F 9R	9F/9R 616 bp	58°C	1 M Betain	9F
Ex. 10	10F 10R	10F/10R 568 bp	58°C	1 M Betain	10F
Ex. 11	11F 11R	11F/11R 437 bp	58°C	1 M Betain	11R
Ex. 12	12F 12R	12F/12R 648 bp	58°C	1 M Betain	12R
Ex. 13	13F 13R	13F/13R 409 bp	54°C	1 M Betain	13R
Ex. 14	14F 14R	14F/14R 410 bp	58°C	1 M Betain	14F
Ex. 15	15F 15R	15F/15R 650 bp	58°C	1 M Betain	15F
Ex. 16	16F 16R	16F/16R 337 bp	54°C	1 M Betain	16F
Ex. 17	17F 17R	17F/17R 489 bp	58°C	1 M Betain	17F
Ex. 18/Ex.19	18F 18R	18F/18R 609 bp	58°C	1 M Betain	18F
Ex. 20	19F 19R	19F/19R 547 bp	56°C	1 M Betain	19R
	20F 20R	20F/20R 701 bp	58°C	1 M Betain	20F

Tabelle 9: PCR- und Sequenzierprotokoll für *SLC26A7*. F=forward, R=Reverse, bp=Basenpaare, Ex.=Exon, PCR-Prod.=PCR-Produkt, Sequenz.primer=Sequenzierprimer

Abbildung 8 - Abbildung 10 zeigen die Etablierungsschritte der PCR-Produkte bei den unterschiedlichen, experimentell ermittelten Annealing Temperaturen.

Im ersten Versuch wurden alle PCR-Produkte mit dem Zusatz von 5M Betain aufbereitet und zur Amplifizierung die Annealing Temperatur von 58°C verwendet. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese (wie in 3.2.3 beschrieben) elektrophoretisch nach der Größe aufgetrennt. Ein 100bp Marker diente zur Kontrolle der Größe der PCR-Produkte. Wie in Abbildung 8 zu sehen, konnte bei fast allen Exonen ein PCR-Produkt vervielfältigt werden. Bei den Exonen 2,13,16 und 20 (Primer 19) wurden keine Banden sichtbar (roter Rahmen). Daher wurde in einem zweiten Schritt für diese Exone die Annealing Temperatur auf 56°C gesenkt. Zudem wurden zum jeweiligen Exon PCR-Produkte mit und ohne Zusatz von 5M Betain angefertigt. Das Bild der Agarosegelelektrophorese in Abbildung 9 zeigt, dass Exon 2 ohne Betain Zugabe und Exon 20 (Primer 19) mit und ohne Betain Zusatz amplifiziert wurden (grüne Pfeile). Bei den Exonen 13 und 16 kam es zu keiner sichtbaren Bande im Agarosegelbild. Aus diesem Grund wurde in einem dritten Versuch die Annealing Temperatur für die Exone 2, 13 und 16 erneut auf 54°C gesenkt. Wie im vorherigen Schritt wurde jeweils eine PCR mit und ohne der Zugabe von 5M Betain erstellt. Die Abbildung 10 zeigt, dass bei 54°C alle PCR-Ansätze vervielfältigt wurden (grüne Pfeile).

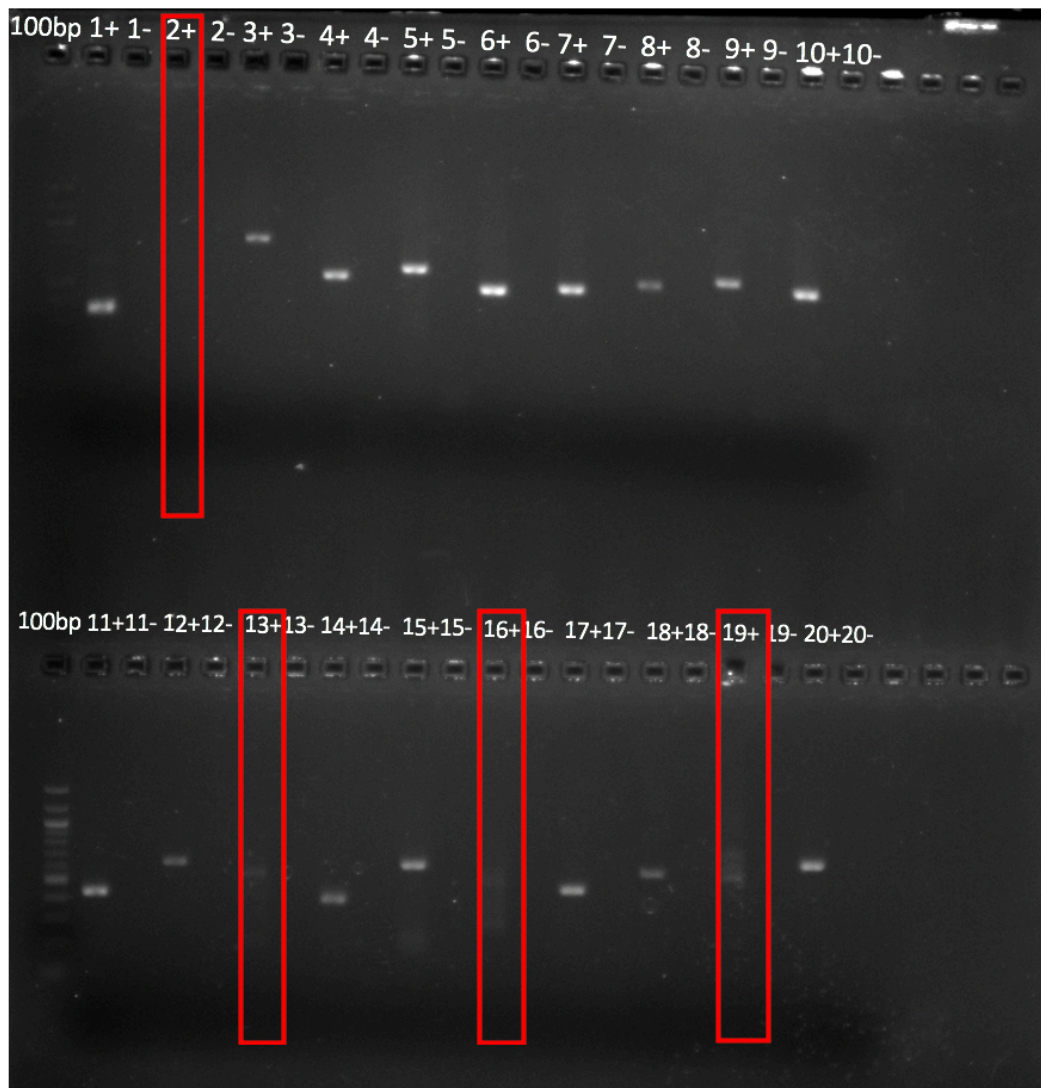


Abbildung 8: 1. Etablierungsschritt: Agarosegel der PCR von *SLC26A7* Exon 1 - 20 bei 58°C Annealing Temperatur und 5M Betain Zusatz. Alle PCR-Produkte wurden bei 58°C amplifiziert mit Ausnahme von Exon 2, 13, 16, 20 (Primer 19), markiert durch rote Rahmen. bp= Basenpaare, + = Kontroll-DNA, - = Negativkontrolle ohne DNA, rote Rahmen = Bande nicht eindeutig sichtbar

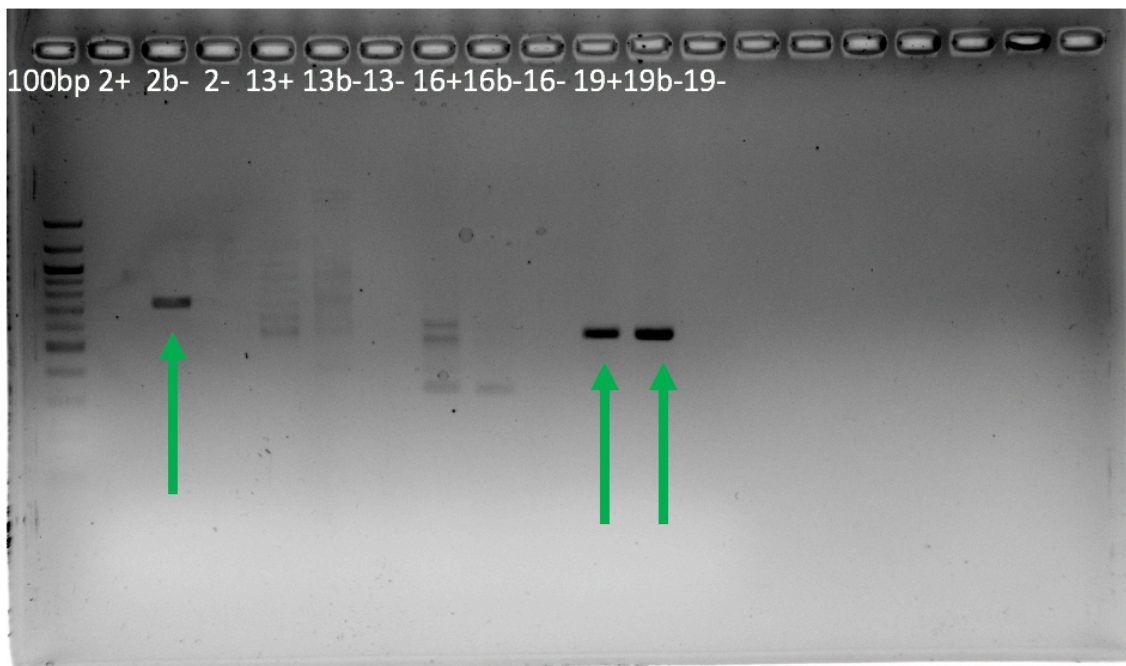


Abbildung 9: 2. Etablierungsschritt: Agarosegel der PCR von *SLC26A7* Exon 2, 13, 16, 20 (Primer 19) mit und ohne Betain bei 56°C Annealing Temperatur. Nur die PCR-Produkte von Exon 2 ohne Betain-Zusatz und Exon 20 (Primer 19) mit und ohne Betain wurden deutlich amplifiziert (grüne Pfeile). Bp= Basenpaare, + =mit Kontroll-DNA und 5M Betain, b- = mit Kontroll-DNA ohne 5M Betain, - = Negativkontrolle ohne DNA, grüner Pfeil = Bande sichtbar

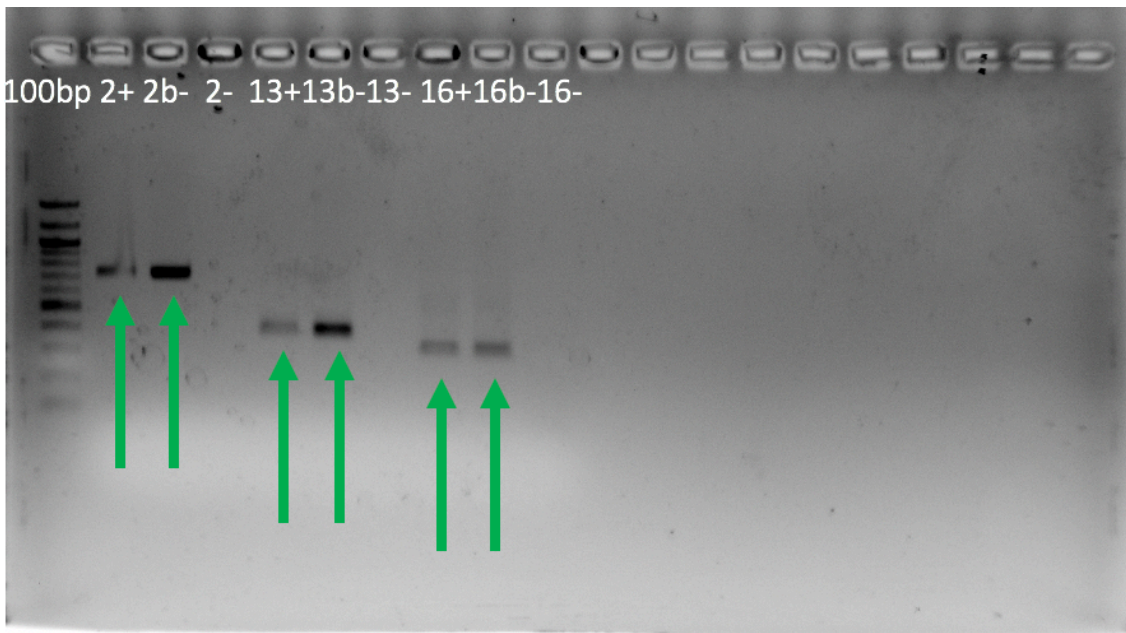


Abbildung 10: 3. Etablierungsschritt: Agarosegel der PCR von *SLC26A7* Exon 2,13,16 mit und ohne Betain bei 54°C Annealing Temperatur. Alle PCR-Produkte der Exone 2, 13, 16 mit und ohne Betain wurden amplifiziert (grüne Pfeile). bp= Basenpaare, + =mit Kontroll-DNA und 5M Betain, b- = mit Kontroll-DNA ohne 5M Betain, - = Negativkontrolle ohne DNA, grüner Pfeil = Bande sichtbar

### 4.2.3 Etablierung der Sequenzierung

Für die Etablierung der Sequenzierungsprimer wurden die aufgereinigten PCR-Produkte (3.2.4) der Kontroll-DNA jeweils mit dem forward- und reverse Primer

(c=5µM) sequenziert. Anschließend wurde das Sequenzierprodukt gefällt und elektrophoretisch aufgetrennt (3.2.6). Mit Hilfe des Programms Sequencher von *Gene Code* wurden die Elektropherogramme beider Primer miteinander verglichen und der Primer verwendet, der das bessere graphische Ergebnis der Elektropherogramme aufwies. Abbildung 11 zeigt am Beispiel von Exon 3 die unterschiedlichen Qualitäten der Sequenzergebnisse bei Verwendung des forward- und reverse Primers. Für dieses Exon wurde der reverse-Primer als Sequenzierprimer in das Standardprotokoll aufgenommen, da er weniger Störfrequenzen im Hintergrund verursacht als der forward-Primer. Das Protokoll der verwendeten Sequenzierprimer für *SLC26A7* befindet sich in Tabelle 9.

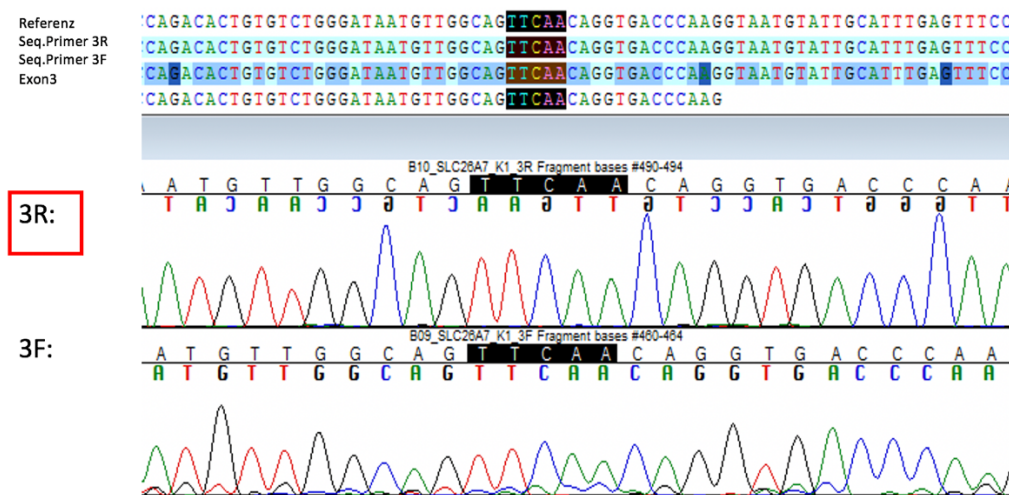


Abbildung 11: Elektropherogramm von *SLC26A7* Exon 3 mit Forward- und Reverse- Sequenzierprimer. Der Reverse-Sequenzprimer für Exon 3 weist ein graphisch besseres Ergebnis ohne Störfrequenzen im Hintergrund auf verglichen mit dem Forward-Sequenzprimer für Exon 3. F=Forward-Sequenzierprimer, R=Reverse-Sequenzierprimer

## 4.3 Auswertung der Sequenzen

### 4.3.1 Polymorphismen in *SLC26A7*

Insgesamt wurden 22 Polymorphismen erfasst und mit den Ergebnissen der Datenbanken *dbSNP*, *gnomAD* und *Exome Variant Server* verglichen. In Tabelle 10 werden die Polymorphismen mit ihrem HGVS (Human Genome Variation Society) - Namen und ihrer rs-ID benannt, sowie ihre Lokalisation und die Auswirkung auf die Genfunktion beschrieben. Die Allelverteilung der Polymorphismen wird außerdem innerhalb des Kollektivs und innerhalb der Bevölkerung anhand der Datenbank von *TOPMed* (Global Population; Sample Size :125568) miteinander verglichen.

<b>HGVS Name/ rs-ID</b>	<b>Exon/ Intron</b>	<b>Allelverteilung des Patientenkollektivs</b>	<b>Allelverteilung in der Bevölkerung*</b>	<b>Gen- funktion</b>
<i>c.-32_-35delTAAA/ rs541944018</i>	5'UTR	W=3 Het=10 Homo=7	(AATA)8AA=42299 delTAAA=83269	2KB upstream Variante
<i>c.193+213 T&gt;G/ rs146878317</i>	Intron 3-4	W=19 Het=0 Homo=1	T=124985 G=583	Intron Variante
<i>c.194-155 G&gt;A/ rs4734009</i>	Intron 3-4	W=2 Het=10 Homo=8	G=60967 A= 64601	Intron Variante
<i>c.477+47 C&gt;T/ rs10107822</i>	Intron 5-6	W=2 Het=9 Homo=9	C=49011 T=76557	Intron Variante
<i>c.643 A&gt;G, p.Ile215Val/ rs16912250</i>	Exon 7	W=18 Het=2 Homo=0	A=121881 G=3687	Missense Variante
<i>c.796-194 del T/ rs35850164</i>	Intron 7-8	W=3 Het=7 Homo=10	TT=30747 delT=94821	Intron Variante
<i>c.879-79 G&gt;A/ rs16912284</i>	Intron 8-9	W=18 Het=2 Homo=0	G=121879 A=3689	Intron Variante
<i>c.879-160 A&gt;G/ rs16912282</i>	Intron 8-9	W=18 Het=2 Homo=0	A=121860 G=3708	Intron Variante

<i>c.1026+108 C&gt;T/ rs7012287</i>	Intron	W=1	C=23422	Intron
	9-10	Het=5 Homo=14	T=102146	Variante
<i>c.1203 T&gt;C, p.Leu401Leu/ rs10109254</i>	Exon	W=14	T=91055	Synonyme
	11	Het=5 Homo=1	C=34513	Variante
<i>c.1219-13 G&gt;A/ rs16912443</i>	Intron	W=18	G=121745	Intron
	11-12	Het=2 Homo=0	A= 3823	Variante
<i>c.1489-161 C&gt;T/ rs77237305</i>	Intron	W=17	C=120054	Intron
	14-15	Het=2 Homo=1	T=5514	Variante
<i>c.1489-26 C&gt;T/ rs10099092</i>	Intron	W=19	C=111587	Intron
	14-15	Het=1 Homo=0	T=13981	Variante
<i>c.1561 A&gt;G, p.T521A/ rs141931769</i>	Exon	W=19	A=125400	Missense
	15	Het=1 Homo=0	G=168	Variante
<i>c.1626+213 G&gt;A/ rs1448679</i>	Intron	W=19	G=121983	Intron
	15-16	Het=1 Homo=0	A=3585	Variante
<i>c.1627-64 A&gt;G/ rs142599083</i>	Intron	W=19	A=123578	Intron
	15-16	Het=0 Homo=1	G=1990	Variante
<i>c.1777-4 C&gt;T/ rs16912805</i>	Intron	W=17	C=115919	Spleiß
	17-18	Het=2 Homo=1	T=9649	Region/ Intron Variante
<i>c.1936-131 T&gt;A/ rs11986042</i>	Intron	W=18	T=121972	Intron
	19-20	Het=2 Homo=0	A=3596	Variante
<i>c*121 C&gt;T/ rs10504905</i>	3'UTR	W=18	C= 114044	3'UTR
		Het=1 Homo=1	T=11524	Variante
<i>c*199 G&gt;A/ rs9297895</i>	3'UTR	W=16	G=108682	3'UTR
		Het=3 Homo=1	A=16886	Variante

<i>c*374 G&gt;T/ rs35588710</i>	3'UTR	W=18	G=114571	3'UTR
		Het=1	T=10997	Variante
		Homo=1		
<i>c*435 C&gt;T/ rs190502117</i>	3'UTR	W=18	C=125407	3'UTR
		Het=2	T=161	Variante
		Homo=0		

Tabelle 10: Gesamtübersicht der gefundenen *SLC26A7*- Polymorphismen bei den untersuchten Patienten. \*(TopMed/Global Population) Sample Size: 125568. UTR= untranslatierte Region, W= Wildtyp, Het= heterozygot, Homo= homozygot, A= Adenin, T= Thymin, C= Cytosin, G= Guanin, del= Deletion

### 4.3.2 Mutationen in *SLC26A7*

Unter den 20 untersuchten Patienten wurde bei einem Patienten (Patient 3) eine Mutation in Exon 14 festgestellt (Tabelle 11).

<b>HGVS Name/ rs-ID</b>	<b>Exon/ Intron</b>	<b>Allelverteilung des Patientenkollektivs</b>	<b>Allelverteilung in der Bevölkerung*</b>	<b>Genfunktion</b>
<i>c.1432_1433delGT, p.V478KfsX11/ rs751908708</i>	Exon 14	W=19 Het=0 Homo=1	TG=125567 delTG=1	Frameshift Mutation/ vorzeitiges Stopcodon

Tabelle 11: Gesamtübersicht der gefundenen *SLC26A7*- Mutationen bei den untersuchten Patienten. \*(TopMed/Global Population) Sample Size: 125568. W= Wildtyp, Het= heterozygot, Homo= homozygot, A= Adenin, T= Thymin, C= Cytosin, G= Guanin, del= Deletion

#### 4.3.2.1 *c.1432\_1433delGT, p.V478KfsX11*

Die Sequenz des Patienten 3 zeigt eine Deletion der Basen GT im kodierenden Bereich des Exon 14 (Abbildung 12). Durch die homozygote Deletion wird eine Verschiebung des Leserasters verursacht. Statt der Aminosäure Valin (V), wie in der Wildtypsequenz, codiert das neue Basentriplett AAG für die Aminosäure Lysin (K). Auf Grund der Frameshift-Mutation kommt es außerdem nach 11 Aminosäuren zu einem vorzeitigen Stopcodon. Das mutierte Protein ist somit 169 Aminosäuren kürzer als der Wildtyp, wodurch wahrscheinlich die letzte Transmembrandomäne verkürzt ist und es zum Wegfall der STAS-Region kommt (Abbildung 5).

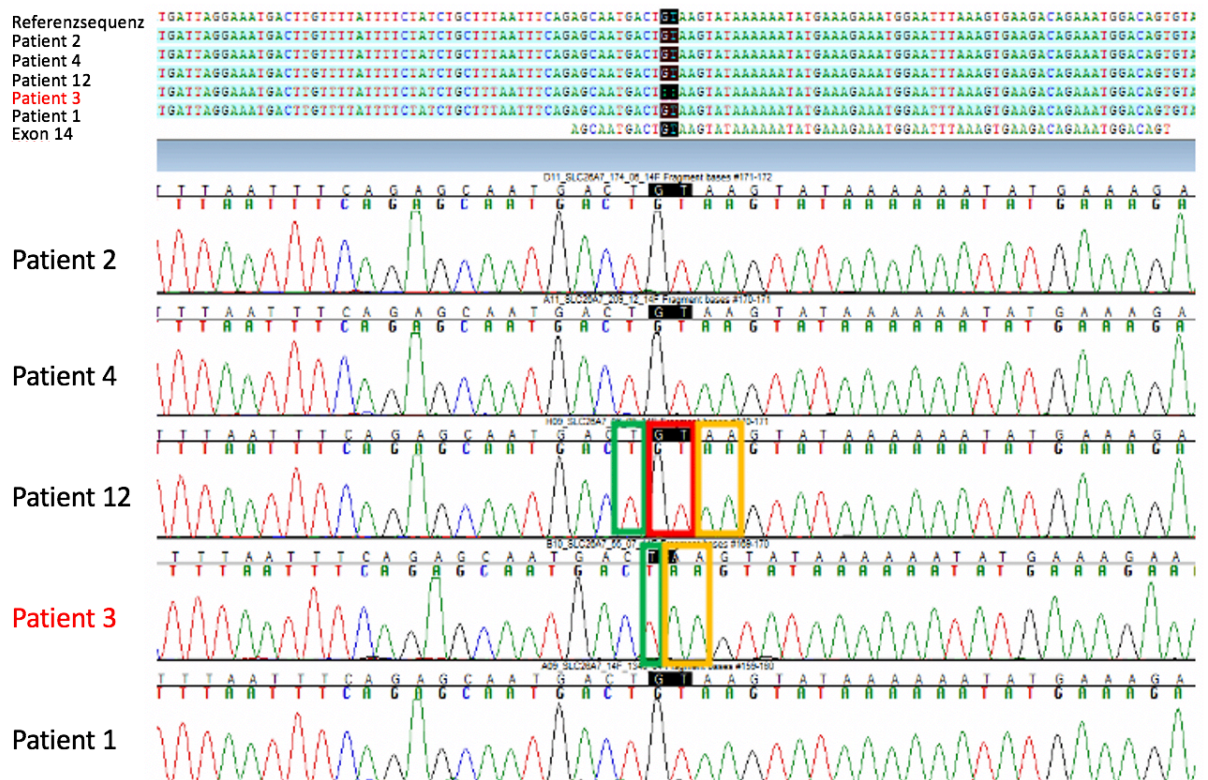
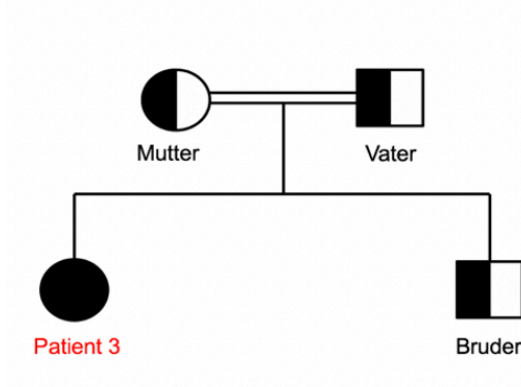


Abbildung 12: Sequenz von *SLC26A7* Exon 14: Patient 3 weist die Mutation c.1432\_1433delGT, p.V478KfsX11 auf. Patienten 2,4,12 und 1 entsprechen an dieser Stelle der Referenzsequenz.

Zur Untersuchung der Ätiologie der Mutation wurde die Familie der Patientin, bestehend aus dem Vater, der Mutter und einem jüngeren Bruder, untersucht. Die Eltern der Patientin sind miteinander blutsverwandt. Die Ergebnisse der Sequenzierung (Abbildung 13) zeigen, dass bei allen 3 Familienmitgliedern eine heterozygote Variante der Mutation c.1432\_1433delGT vorliegt. Bei der Mutter und dem Bruder sind keine klinischen Anzeichen einer Schilddrüsenerkrankung vorhanden, sie sind gesund. Der Vater wird auf Grund einer Autoimmunthyreoiditis mit 150µg L-Thyroxin behandelt.

## A. Familienstammbaum von Patient 3



## B. Sequenzierung des Exon 14 von *SLC26A7* der Familienmitglieder

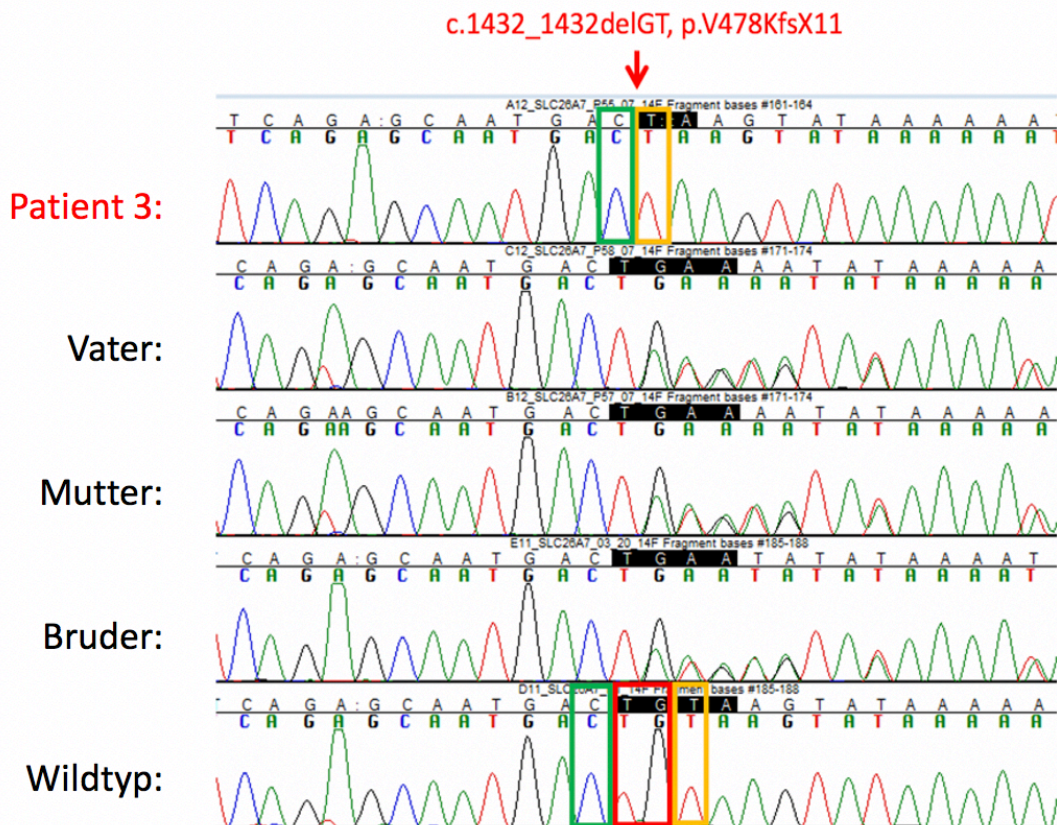


Abbildung 13: (A) Stammbaum der Familie von Patient 3 und (B) Sequenzierung des Exon 14 von *SLC26A7* der Familienmitglieder: Die blutsverwandten Eltern und der Bruder sind heterozygote Träger der Mutation c.1432\_1432delGT. Die Mutter und der Bruder sind gesund, der Vater weist eine Autoimmunthyreoiditis auf. Der Patient 3 ist ein homozygoter Träger der Mutation und an kongenitaler Hypothyreose erkrankt.

### 4.3.3 Noch nicht beschriebene Veränderungen in *SLC26A7*

Bei der Sequenzierung der 20 Patienten wurden 3 Veränderungen in *SLC26A7* gefunden, die in den Datenbanken *dbSNP*, *gnomAD* und *Exome Variant Server* bisher noch nicht beschrieben worden sind. Um die VUS bewerten zu können, wurden zusätzlich 20 Kontrollen sequenziert und auf diese Veränderungen untersucht. Die Allelverteilung innerhalb des Patientenkollektivs und innerhalb der Kontrollen, sowie Name und Lokalisation der Veränderung sind in Tabelle 12 aufgelistet. Die Auswirkungen der Veränderungen auf die Genfunktion sind unbekannt.

<b>HGVS Name/ rs-ID</b>	<b>Exon/ Intron</b>	<b>Allelverteilung des Patientenkollektivs</b>	<b>Allelverteilung der Kontrollen (20)</b>	<b>Gen- funktion</b>
c.796-123 C>A/-	Intron	W=19	W=20	unbekannt
	7	Het=1 Homo=0	Hete=0 Homo=0	
c.1259_1267dupTG CTAATAC, p.Q423LinsLIQ/-	Exon	W=19	W=20	unbekannt
	12	Het=0 Homo=1	Hete=0 Homo=0	
c.1935+176 del T/-	Intron	W=18	W=19	unbekannt
	19	Het=1 Homo=1	Hete=1 Homo=0	

Tabelle 12: Gesamtübersicht der noch nicht beschriebenen Veränderungen in *SLC26A7* bei den untersuchten Patienten. \* (TopMed/Global Population) Sample Size: 125568. W= Wildtyp, Het= heterozygot, Homo= homozygot, A= Adenin, T= Thymin, C= Cytosin, G= Guanin, del= Deletion, ins=Insertion, dup= Duplikation

#### 4.3.3.1 c.796-123 C>A

Bei Patient 6 liegt im Intronbereich zwischen Exon 7 und 8 ein Basenaustausch von Cytosin zu Adenin an der Stelle c.796-123 (Tabelle 12) als heterozygote Veränderung vor (Abbildung 14). Die Transversion wurde bisher in den Datenbanken noch nicht beschrieben und tritt auch bei den Kontrollen nicht auf.

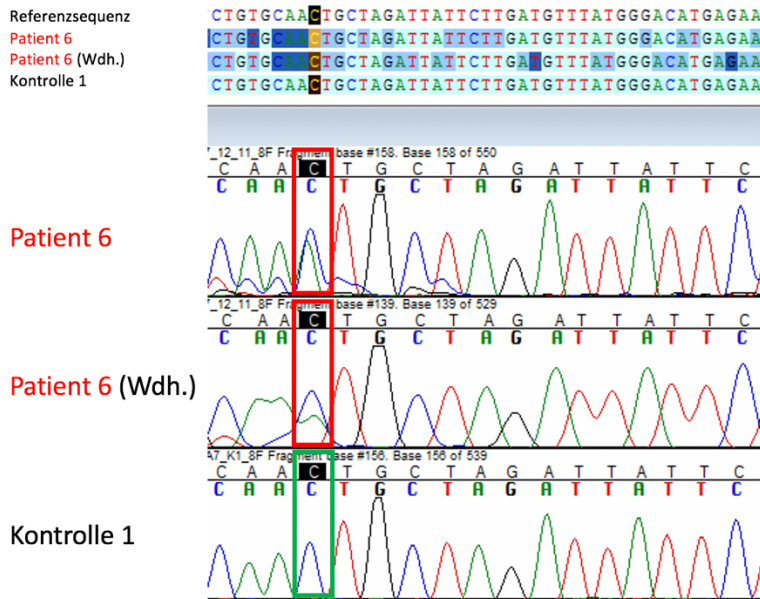


Abbildung 14: Sequenz von *SLC26A7* Intron 7: Patient 6 ist Träger der VUS c.796-123 C>A. Kontrolle 1 entspricht der Referenzsequenz.

#### 4.3.3.2 c.1259\_1267dupTGCTAATAC, p.Q423LinsLIQ

Die Sequenz von Exon 12 bei dem Patienten 19 zeigt eine homozygote Insertion der Basen TGCTAATAC im codierenden Bereich (Abbildung 15). Bei der Insertion c.1259\_1267dupTGCTAATAC handelt es sich um eine Duplikation der vorherigen Basen, wodurch das Leseraster erhalten bleibt. Diese Veränderung ist bisher unbekannt und wurde nur bei diesem Patienten identifiziert.

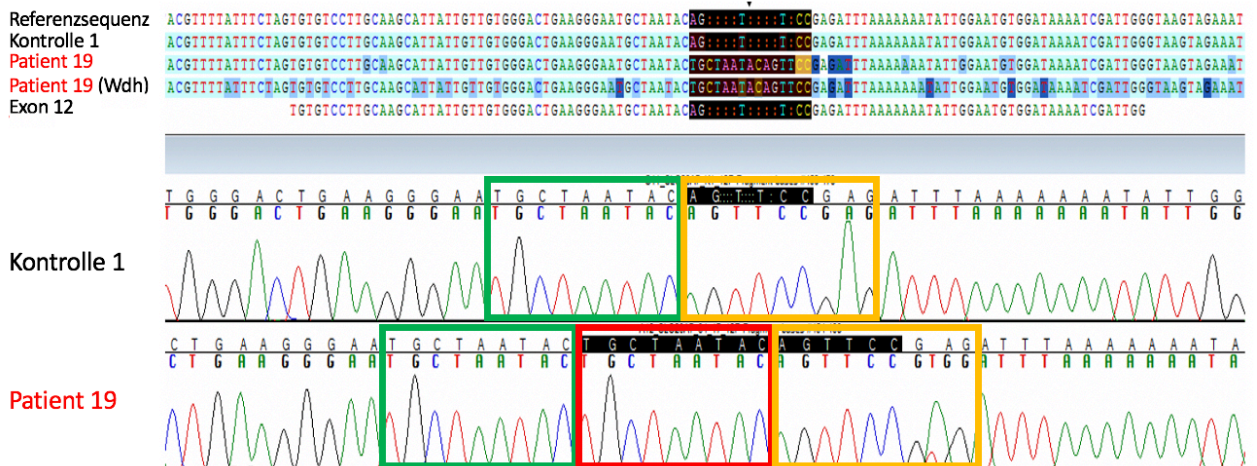
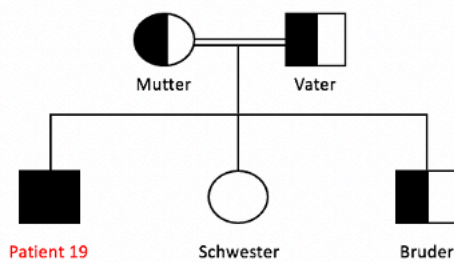


Abbildung 15: Sequenz von *SLC26A7* Exon 12: Patient 19 weist die VUS c.1259\_1267dupTGCTAATAC auf. Kontrolle 1 entspricht der Referenzsequenz.

Die Untersuchung der Familienmitglieder auf c.1259\_1267dupTGCTAATAC zeigte, dass bei allen die Veränderung heterozygot auftritt mit Ausnahme der Schwester, ihre Sequenz entspricht an dieser Position dem Wildtyp (Abbildung 16).

## A. Familienstammbaum von Patient 19



## B. Sequenzierung des Exon 12 von *SLC26A7* der Familienmitglieder

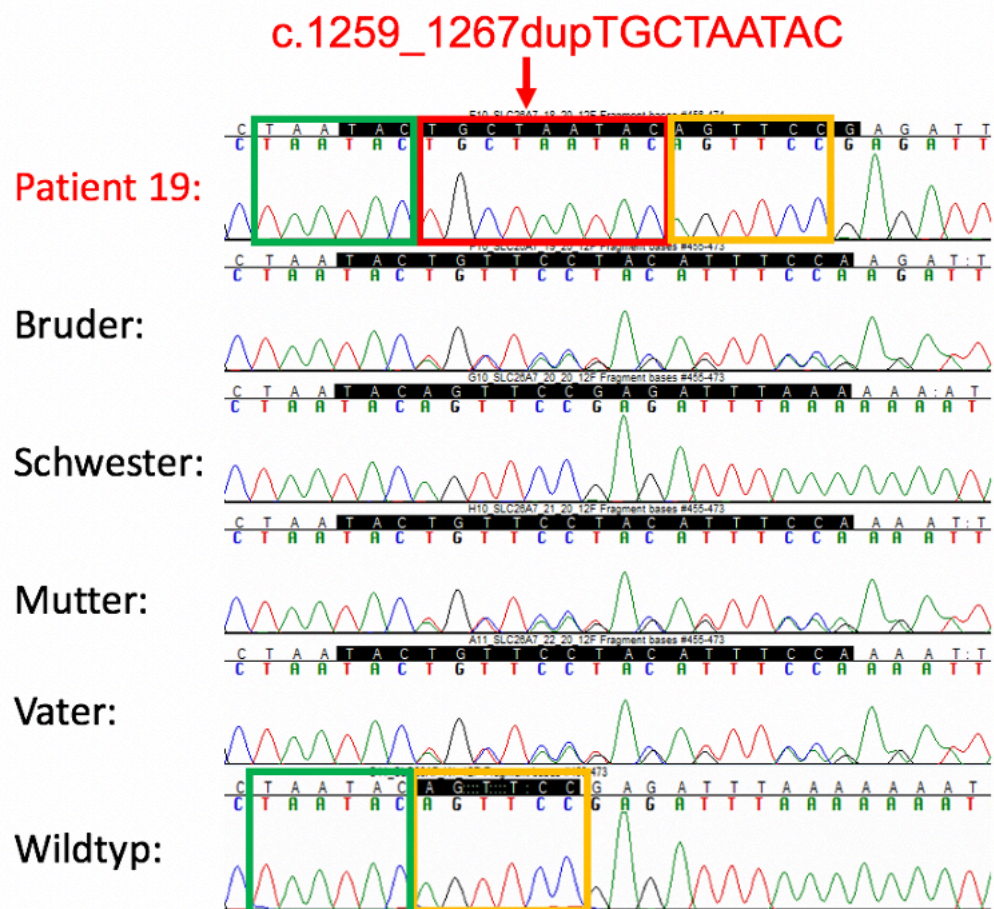


Abbildung 16: (A) Stammbaum der Familie von Patient 19 und (B) Sequenzierung des Exon 12 von *SLC26A7* der Familienmitglieder: Die blutsverwandten Eltern und der Bruder sind heterozygote Träger der Variante c.1259\_1267dupTGCTAATAC. Die Schwester weist die Variante nicht auf und entspricht dem *SLC26A7* Wildtyp.

### 4.3.3.3 c.1935+176 del T

Die Patienten 7 und 15 zeigten eine Deletion der Base Thymin im Intronbereich zwischen Exon 19 und 20. Bei Patient 7 liegt diese Veränderung in homozygoter Form und bei Patient 15 in heterozygoter Form vor (Abbildung 17). Diese Variante wurde

bislang nicht beschrieben, allerdings trat sie auch bei den Kontrollen einmal heterozygot auf (Tabelle 12).

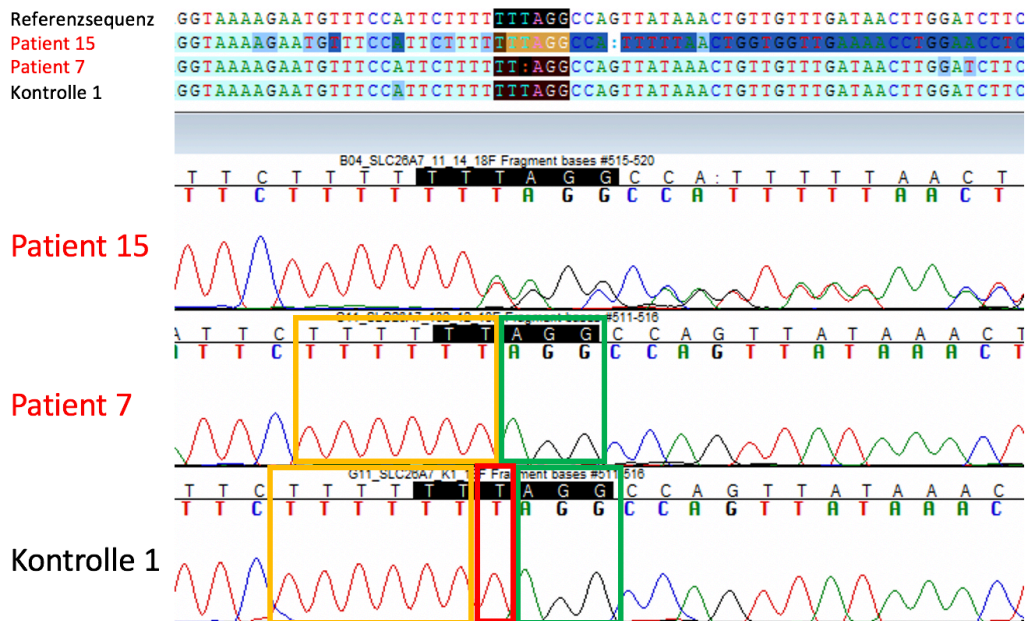


Abbildung 17: Sequenz von *SLC26A7* Intron 19: Patient 7 und 15 weisen die VUS c.1935+176 del T auf. Kontrolle 1 entspricht der Referenzsequenz.

#### 4.3.4 Zusammenfassung

Bei der Untersuchung von *SLC26A7* wurden bei 20 ausgewählten Patienten (siehe 3.2.1) insgesamt 22 Polymorphismen, eine Mutation und drei Veränderungen, die in den Datenbanken bisher nicht beschrieben worden sind, identifiziert.

Bei den 22 Polymorphismen handelt es sich um 14 Varianten innerhalb der Intronbereiche, eine 2KB upstream Variante, vier 3'UTR Varianten, zwei missense und eine synonyme Variante innerhalb der Exonregion (Tabelle 10). Die Polymorphismen wurden mit den Datenbanken *dbSNP*, *gnomAD* und *Exome Variant Server* abgeglichen und traten mit einer MAF von >0,001% auf.

Patient 3 wies die Mutation c.1432\_1433delGT, p.V478KfsX11 in Exon 14 auf (Abbildung 12). Durch die Deletion der Basen Guanin und Thymin kommt es zum frühzeitigen Abbruch der Translation und somit zu einem verkürzten *SLC26A7*-Protein, bei dem die STAS-Region fehlt (siehe 4.3.2.1, Abbildung 5).

Zusätzlich konnten drei bisher nicht beschriebene Veränderungen erfasst werden (Tabelle 12). Die beiden Varianten c.796-123 C>A und c.1935+176 del T liegen im Intronbereich, während die Variante c.1259\_1267dupTGCTAATAC, p.Q423LinsLIQ im Exon 12 lokalisiert ist. Unter den ausgewählten Patienten traten die Varianten

c.796-123 C>A und c.1259\_1267dupTGCTAATAC, p.Q423LinsLIQ jeweils nur einmal auf und kamen nicht bei 20 durchgeführten Kontrollen vor. Im Gegensatz dazu wurde die Variante c.1935+176 del T insgesamt bei zwei Patienten identifiziert sowie einmal innerhalb der Kontrollgruppe.

## 5 Diskussion

### 5.1 Auswahlkriterien der Kandidaten und Patientenkollektiv

Die Auswahlkriterien für die in dieser Arbeit untersuchten Patienten orientierten sich an den bisher in der Literatur beschriebenen Patientenfällen mit *SLC26A7*-Mutationen [9-11, 175, 177].

Die Festlegung der Auswahlkriterien erwies sich als schwierig, da sich die Fallbeschreibungen der bisher publizierten Fälle teilweise unterscheiden [9-11, 175, 177]. So wurden sowohl Patienten mit als auch ohne Struma beschrieben [9-11, 175, 177]. Ein Patient zeigte einen stark erhöhten TG-Wert, während dieser in anderen Veröffentlichungen nicht angegeben wird [10]. Bei Zou et al. finden sich neben der *SLC26A7*-Mutation weitere heterozygote Mutationen in *TG* und *SLC26A4* [9]. Hierbei entsteht die Frage nach einer polygenen Ätiologie im Zusammenhang mit *SLC26A7* (vgl. 2.2.4). Anhand der genannten Merkmale von Patienten bereits beschriebener Veränderungen in *SLC26A7* wurden zur Auswahl der zu untersuchenden Patienten die folgenden Kriterien entwickelt: Es wurden alle Patienten eingeschlossen, die eine Struma oder eine normal angelegte Schilddrüse hatten, erhöhte TG-Werten aufwiesen und bei denen die Untersuchung der bisher bekannten Kandidatengene für Schilddrüsenhormonbiosynthesestörungen keinen klassischen Befund ergab. Zusätzlich wurden 4 Patienten phänotypisch ausgewählt, um zu untersuchen, ob sich *SLC26A7*- Mutationen auch klinisch diagnostizieren lassen.

Ein Problem beim Einschluss der untersuchten Patienten war, dass uneinheitliche und teilweise unvollständige Angaben beim Einsenden zur molekulargenetischen Untersuchung übermittelt wurden. Untersuchungen wie Sonographie, die der Diagnostik der CH dienen (Kapitel 2.2.3), sind oft untersucherabhängig. Auch die Laborwerte TSH, fT3 (freies T3), fT4 und TG müssen immer mit den laborspezifischen und altersentsprechenden Referenzwerten betrachtet werden [79, 81]. Hinzu kommt, dass nicht immer alle Laborparameter angegeben wurden. So sind bei 5 von 20 Patienten keine genauen TSH-Werte bekannt (siehe Tabelle 8). Da der TG-Wert nicht fester Teil der Routinediagnostik ist und meist erst im Verlauf bestimmt wird (Kapitel 2.2.3), sind hier nur bei 12 von 20 Patienten die Werte bekannt (siehe Tabelle 8). Zudem ist zu beachten, dass der TG-Wert physiologisch durch den TSH-Wert beeinflusst wird [197]. So ist durch den TSH-Anstieg eine TG-Erhöhung zu erwarten.

Unter Beachtung der oben genannten Auswahlkriterien (Abbildung 7) gelang es, *SLC26A7*-Varianten zu detektieren. Aus 665 CH-Patienten, die auf Grund von Hormonbiosynthesestörungen im Labor von ██████████ untersucht wurden und werden, wurden 20 Patienten durch präzise Ein- und Ausschlusskriterien ausgewählt, unter denen eine Mutation: c.1432\_1433delGT, p.V478KfsX11 sowie drei bisher unbekannte Varianten: c.796-123 C>A, c.1259\_1267dupTGCTAATAC (p.Q423LinsLIQ), c.1935+176 del T in *SLC26A7* identifiziert wurden (Kapitel 4.3). Der Patient 19 mit einer bisher unbekanntem Duplikation c.1259\_1267dupTGCTAATAC, p.Q423LinsLIQ wurde nur anhand seines Phänotyps prospektiv ausgewählt (vgl. 3.1.6). Somit können Patienten mit *SLC26A7*-Varianten auch anhand von klinischen Kriterien CH und Struma ausfindig gemacht werden. Daher ist eine Aufnahme von *SLC26A7* in die Routinediagnostik bei dieser Klinik ist zu diskutieren.

Die Patienten, bei denen Mutationen und unbekannte Varianten gefunden wurden, zeigten alle hochgradig erhöhte TSH-Werte, 3 von 5 Patienten wiesen eine Struma auf und die TG-Werte waren bei 4 von 5 Patienten erhöht, insbesondere bei dem Patienten mit der ursächlichen Mutation (siehe Tabelle 8). Diese Merkmale decken sich mit den bereits veröffentlichten Fallbeschreibungen [9-11, 175, 177].

## **5.2 Sequenzen und Datenbanken**

### **5.2.1 Sequenzen**

In dieser Arbeit wurde zur Untersuchung des *SLC26A7*-Gens die Methode der Sanger-Sequenzierung angewandt. Hierfür wurden im ersten Schritt die PCR-Primer für die Exonabschnitte von *SLC26A7* erstellt, im nächsten Schritt durch experimentelles Ermitteln von Annealing-Temperaturen ein zuverlässiges PCR-Protokoll etabliert und abschließend geeignete Sequenzierungsprimer entwickelt und angewandt. Dieses PCR- und Sequenzierungsprotokoll von *SLC26A7* (siehe Tabelle 9) ist gut reproduzierbar und damit ideal für die Routinediagnostik geeignet.

Die Methoden des NGS, darunter WES, wurden in den beschriebenen Veröffentlichungen bevorzugt angewendet, um größere Sequenzdaten bis hin zum ganzen Genom zu sequenzieren und um neue Gene im Zusammenhang von Erkrankungen zu detektieren [9-11, 175, 177, 198]. Das Sequenzieren und Auswerten großer Datenmengen mit Hilfe dieser Methode ist jedoch sehr komplex und kann zu Sequenzfehlern führen, was die Auswertung im Hinblick auf die klinische Relevanz erschwert [198, 199]. Deshalb werden durch NGS gefundene Mutationen mit Hilfe des

Goldstandards, der Sanger Sequenzierung, validiert [10]. Die Sequenzen in dieser Arbeit wurden nach der Sanger Methode angefertigt, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die gefundenen Varianten sicher vorliegen. Außerdem spiegeln die Sequenzabbildungen ohne großes „Hintergrundrauschen“ die äußerst gute Qualität der angefertigten Sequenzen und des etablierten *SLC26A7*-Protokolls wider.

### 5.2.2 Datenbanken

Die in dieser Arbeit identifizierten Veränderungen wurden mit den Datenbanken *gnomAD*, *dbSNP* und *Exome Variant Server* verglichen [183-185]. Diese Datenbanken verwalten eine Vielzahl an großen Sequenzierungsprojekten, die das Genom von unzähligen Menschen weltweit sequenziert haben [183-185]. Somit wurde in dieser Arbeit eine große, bevölkerungsunabhängige Vergleichsgruppe angewendet, um Polymorphismen von Mutationen unterscheiden zu können. Grundsätzlich ist zu bedenken, dass diese Daten mittels WES produziert werden, wodurch Fehler in den Datenbanken besonders bei der Beurteilung von VUS nicht ausgeschlossen werden können.

### 5.3 Polymorphismen in *SLC26A7*

Für die verwendete Referenzsequenz *ENST00000523719.5* von *Ensembl* wurden, wie bereits unter 4.2.1 erwähnt, sehr viele Polymorphismen in den Datenbanken beschrieben [159]. Beim Auswerten der 20 Patienten sind insgesamt nur 22 Polymorphismen aufgetreten. Das sind weniger Polymorphismen als den Datenbanken zufolge zu erwarten waren. Eine mögliche Erklärung könnte die auf NGS basierende Datengrundlage in den verwendeten Datenbanken sein (vgl. 5.2), die durchaus fehleranfällig ist. Die NGS-Ergebnisse werden ungeprüft in die Datenbanken integriert.

Außerdem liegt bei den Polymorphismen c.-32\_-35delTAAA, c.477+47 C>T, c.796-194 del T und c.1026+108 C>T innerhalb der hier untersuchten Patienten, sowie innerhalb der vergleichenden Bevölkerungsgruppe von *TOPMed* die Abweichung des Allels häufiger vor als das Referenzallel (siehe Tabelle 10). Hier ist ein Fehler in der hinterlegten Referenzsequenz stark anzunehmen.

Bei dem Polymorphismus c.194-155 G>A tritt die Base Adenin innerhalb der Kandidaten häufiger auf als die Referenzbase Guanin: Unter den 20 Kandidaten entsprechen nur 2 dem Wildtyp, die Base Adenin kommt an dieser Stelle hingegen bei 8 Patienten in homozygoter Form und bei 10 Patienten in heterozygoter Form vor

(siehe Tabelle 10). Die Häufigkeit der Vergleichsgruppe von *TOPMed* (G=60967 / A=64601, Sample Size=125568) entspricht jedoch dem angegebenen Referenzallel Adenin. Das kann durch bevölkerungsabhängige Allelexpression erklärt werden. So zeigen die Ergebnisse des ALFA (Allele Frequency Aggregator)- Projekt, dass an der Position c.194-155 die Base Adenin beispielsweise häufiger in der europäischen Bevölkerung exprimiert wird [200]. In der African American Population kommt hingegen häufiger die Base Guanin vor (Abbildung 18) [200]. Somit kann das Referenzallel abhängig von der zu untersuchenden Bevölkerung Adenin oder Guanin sein.

### ALFA Allele Frequency

The ALFA project provide aggregate allele frequency from dbGaP. More information is available on the project [page](#) including descriptions, data access, and terms of use.

Release Version: 20201027095038

Search:

Population	Group	Sample Size	Ref Allele	Alt Allele
<b>Total</b>	Global	27556	G=0.44404	A=0.55596, C=0.00000
European	Sub	16798	G=0.30438	A=0.69562, C=0.00000
African	Sub	6034	G=0.7761	A=0.2239, C=0.0000
African Others	Sub	200	G=0.825	A=0.175, C=0.000
African American	Sub	5834	G=0.7744	A=0.2256, C=0.0000
Asian	Sub	158	G=0.316	A=0.684, C=0.000
East Asian	Sub	102	G=0.373	A=0.627, C=0.000
Other Asian	Sub	56	G=0.21	A=0.79, C=0.00
Latin American 1	Sub	292	G=0.455	A=0.545, C=0.000
Latin American 2	Sub	2770	G=0.5563	A=0.4437, C=0.0000
South Asian	Sub	110	G=0.336	A=0.664, C=0.000

Abbildung 18: ALFA Allele Frequency für den Polymorphismus c.194-155 G>A, [200]

## 5.4 Mutation in *SLC26A7*

Patient 3 zeigt an den Positionen c.1432\_1433 eine homozygote Deletion der Basen GT, die zu einer Verschiebung des Leserasters und nach 11 Aminosäuren zu einem verfrühten Abbruch der Aminosäuresynthese führt. Durch den Translationsabbruch entsteht wahrscheinlich ein Protein, das insgesamt 169 Aminosäuren kürzer ist als der *SLC26A7*-Wildtyp. Bei dieser Veränderung handelt es sich um eine Mutation, da die Variante in Datenbanken eine MAF <0,001% aufweist und auch nicht innerhalb der 20 Kontrollpatienten aufgetreten ist. Mit Hilfe von *in silico*-Analysen wird im Folgenden die Bedeutung der Mutation im Hinblick auf die Funktion von *SLC26A7* und CH diskutiert.

#### 5.4.1 c.1432\_1433delGT, p.V478KfsX11

##### *Patientin 3*

Die Patientin zeigte nach einer komplikationslosen Schwangerschaft keine Auffälligkeiten bei der Geburt. Das Geburtsgewicht betrug 3140g und die Körperlänge lag bei 52 cm, was im Normalbereich der Perzentile liegt. Die Diagnose CH wurde im Rahmen des Neugeborenen Screenings gestellt und vier Tage später durch einen stark erhöhten TSH-Wert von 704 mU/l (NW: 0,2-4,2 mU/L) und erniedrigte fT3-Werte von 1.8 pg/ml (NW: 2.3-4.9 pg/ml), fT4-Werte von 0.3 ng/dl (NW: 0.9-1.7 ng/dl) bestätigt. Der gemessene TG-Wert von über 3000 ng/ml (NW: bis 50 ng/ml) deutete auf eine Schilddrüsenhormonbiosynthesestörung hin. Außerdem wurde mittels Sonographie eine vergrößerte, hyperperfundierte Schilddrüse mit orthotoper Lage bei der Patientin nachgewiesen. Bei der klinischen Untersuchung wurden bis auf einen leichten Ikterus und einen Hypotonus keine weiteren Auffälligkeiten festgestellt. Die Patientin wurde umgehend mit einer Dosis von 50 µg/d L-Thyroxin behandelt und zeigte im Therapieverlauf eine euthyreote Stoffwechsellage sowie eine normale Entwicklung. Die Struma bildete sich zurück. Bei der molekulargenetischen Untersuchung wurden in den bisher bekannten Kandidatengen keine ursächlichen Mutationen gefunden.

Die Eltern der Patientin stammen ursprünglich aus dem Iran und sind blutsverwandt. Nach der Tochter bekamen die Eltern einen weiteren Sohn (Abbildung 13). Bei der Mutter und dem jüngeren Bruder liegen keine Schilddrüsenstörungen vor. Der Vater ist an einer Autoimmunthyreoiditis erkrankt, die mit 100 µg/d L-Thyroxin behandelt wird. Die Mutation wurde von den Eltern vererbt, die beide heterozygote Träger sind. Der jüngere Bruder ist ebenfalls heterozygoter Konduktor.

##### *Lokalisation der Mutation*

Die Mutation befindet sich an der Position der 478. Aminosäure (Wildtyp: Valin/ c.1432\_1433delGT: Lysin). *Phobius* und *Ensembl* zeigen an, dass diese Aminosäure im Protein hinter der letzten Transmembrandomäne und vor der STAS-Domäne lokalisiert ist (Abbildung 19 und Abbildung 20). Durch den frühzeitigen Abbruch der Translation würde demnach die STAS-Domäne verloren gehen, wie die Abbildung 19 und Abbildung 20 darstellen. Man geht davon aus, dass durch den Verlust der STAS-Region SLC26A7 nicht mehr an der Membranoberfläche exprimiert werden kann und die Funktion als Iodid-Transporter verloren geht, wie Ishii et al. experimentell nachgewiesen haben [10].



## Mutations-und Spleißanalyse

Die *in silico* Mutationsanalyse durch das Programm *Mutation Taster* sagt eine Veränderung der Spleiß-Stellen vorher und prognostiziert die Frameshift-Mutation mit verfrühtem Stopp-Codon als krankheitsverursachend (Abbildung 21).



[documentation](#)

### mutation t@sting

**Prediction disease causing** Model: *complex\_aaa*, prob: 1 (classification due to NMD, [real probability is shown anyway](#)) [\(explain\)](#)

**Summary** [hyperlink](#)

- NMD
- amino acid sequence changed
- frameshift
- protein features (might be) affected
- splice site changes

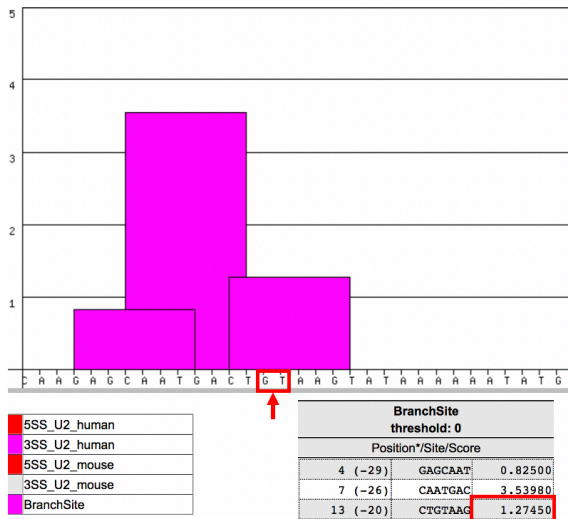
analysed issue	analysis result																									
name of alteration	no title																									
alteration (phys. location)	chr8:92375710_92375711delGT																									
HGNC symbol	<a href="#">SLC26A7</a>																									
Ensembl transcript ID	<a href="#">ENST00000523719</a>																									
Genbank transcript ID	N/A																									
UniProt peptide	<a href="#">Q8TE54</a>																									
alteration type	deletion																									
alteration region	CDS																									
DNA changes	c.1432_1433delGT cDNA.1704_1705delGT g.153989_153990delGT																									
AA changes	V478Kfs*11																									
position(s) of altered AA if AA alteration in CDS	478 (frameshift or PTC - further changes downstream)																									
frameshift	yes																									
known variant	Variant was neither found in ExAC nor 1000G. <a href="#">Search ExAC</a>																									
protein features	<table border="1"> <thead> <tr> <th>start (aa)</th> <th>end (aa)</th> <th>feature</th> <th>details</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>470</td> <td>656</td> <td>TOPO_DOM</td> <td>Cytoplasmic (Potential).</td> <td>lost</td> </tr> <tr> <td>492</td> <td>641</td> <td>DOMAIN</td> <td>STAS.</td> <td>lost</td> </tr> <tr> <td>521</td> <td>521</td> <td>CONFLICT</td> <td>T -&gt; A (in Ref. 4; AA114475).</td> <td>lost</td> </tr> <tr> <td>641</td> <td>656</td> <td>REGION</td> <td>Membrane targeting.</td> <td>lost</td> </tr> </tbody> </table>	start (aa)	end (aa)	feature	details		470	656	TOPO_DOM	Cytoplasmic (Potential).	lost	492	641	DOMAIN	STAS.	lost	521	521	CONFLICT	T -> A (in Ref. 4; AA114475).	lost	641	656	REGION	Membrane targeting.	lost
start (aa)	end (aa)	feature	details																							
470	656	TOPO_DOM	Cytoplasmic (Potential).	lost																						
492	641	DOMAIN	STAS.	lost																						
521	521	CONFLICT	T -> A (in Ref. 4; AA114475).	lost																						
641	656	REGION	Membrane targeting.	lost																						

Abbildung 21: *Mutation Taster* Vorhersage zu c.1432\_1433delGT, p.V478KfsX11 [186]. Die Veränderung c.1432\_1433delGT, p.V478KfsX1 wird als krankheitsverursachend eingestuft.

Auch die Spleißanalysen mit *ESEfinder* und *SpliceAID* sagen unterschiedliche Spleißereigenschaften verglichen mit dem Wildtyp voraus.

Das *in silico*-Programm *ESEfinder* zeigt, dass sich die Position einer Verzweigungsstelle (branch site) im Vergleich zum Wildtyp um 2 bp zum 5'Ende verschiebt und sich ihre Wahrscheinlichkeit von 1.27 auf 2.63 erhöht (Abbildung 22). Außerdem geht durch die Deletion die Bindungsstelle für das SRProtein SRSF5 (SRp40 round 3 winner/ grüner Balken) verloren, wie in Abbildung 23 dargestellt wird.

Wildtyp:



c.1432\_1433delGT:

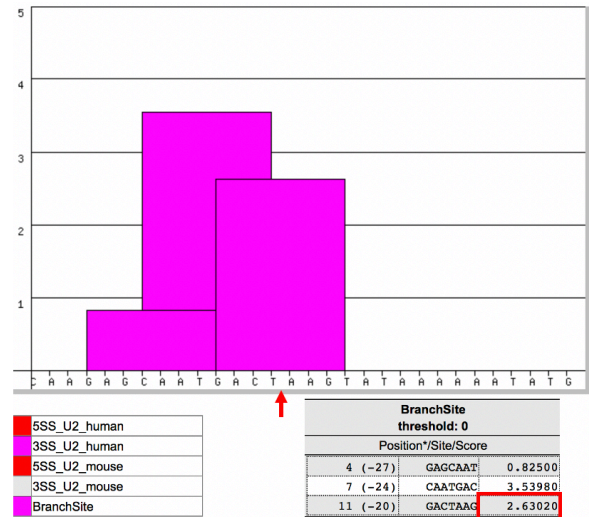
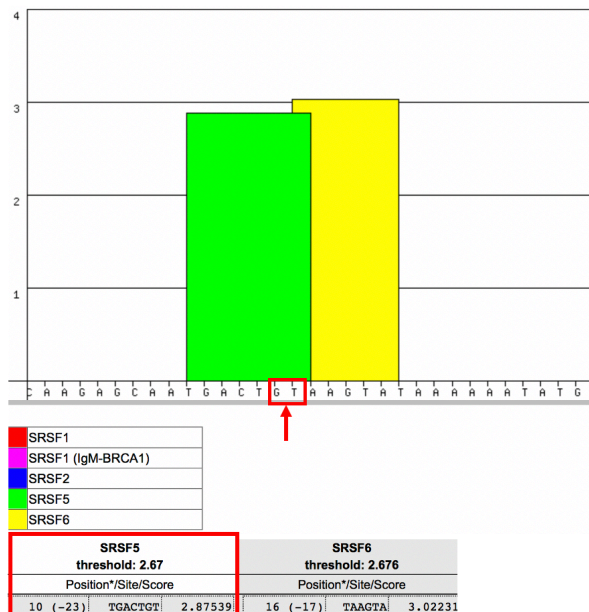


Abbildung 22: *ESEfinder*-Analyse der Splice Sites: Vergleich *SLC26A7* Wildtyp mit c.1432\_1433del GT [188]. Durch die Deletion der Basen GT an den Positionen c.1432 und c.1433 (roter Pfeil) bei c.1432\_1433delGT kommt es zu einer Erhöhung der Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer BranchSite (lila Balken/ rote Markierung).

Wildtyp:



c.1432\_1433delGT:

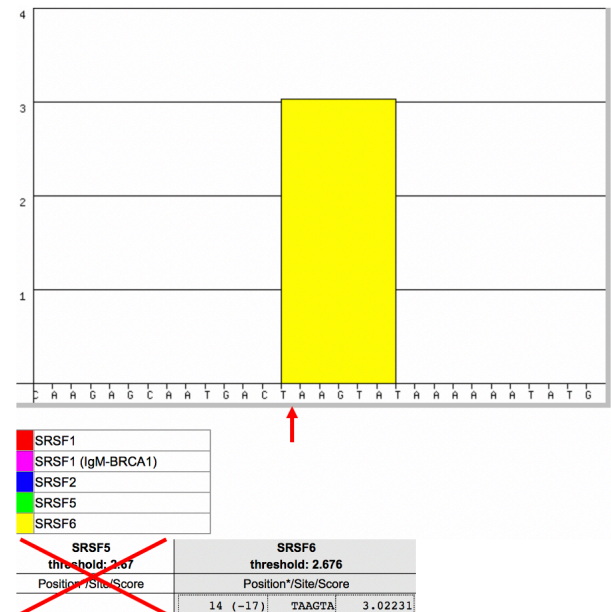


Abbildung 23: *ESEfinder*-Analyse der Bindungsstellen von SRProteinen: Vergleich *SLC26A7* Wildtyp mit c.1432\_1433del GT [188]. Durch die Deletion der Basen GT kommt es zu einem Wegfall der Bindungsstelle für das Protein SRSF5, die beim *SLC26A7* Wildtyp vorliegt (grüner Balken/ rote Markierung).

In der *SpliceAID*-Analyse werden weitere Protein-Bindungsstellen innerhalb der Sequenz untersucht, die eine Rolle beim RNA-Spleißen spielen. Die mutierte Sequenz verursacht den Wegfall der Bindungsstelle für das Protein Fox-1 und Fox-2. Es entsteht bei der Mutation jedoch eine neue Bindestelle für das hnRNP DL Protein (Abbildung 24). Die Proteine Fox-1, Fox-2 und hnRNP DL spielen eine regulatorische



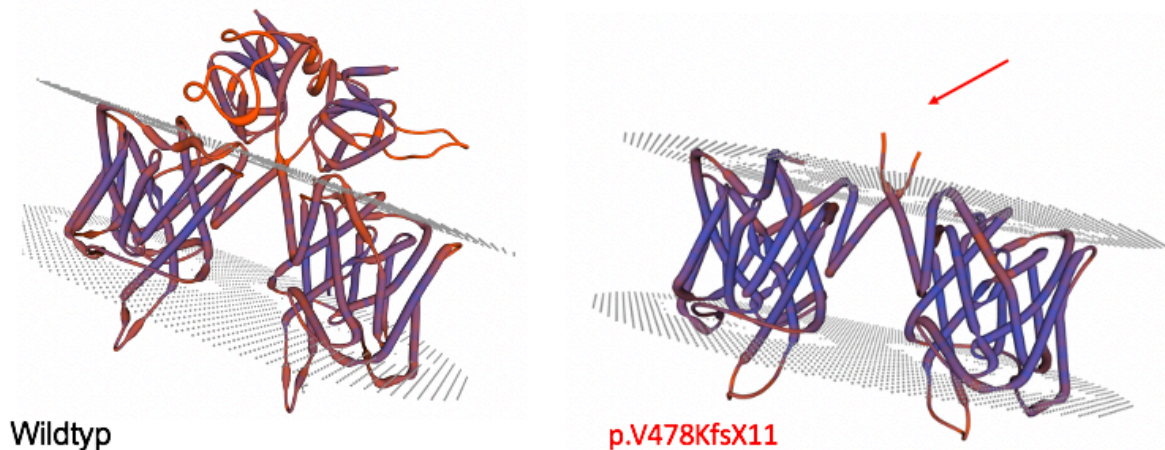


Abbildung 25: SWISS-MODEL: Vergleich *SLC26A7* Wildtyp mit p.V478KfsX11 [193]. Im 3-D Modell sieht man bei p.V478KfsX11 verglichen mit dem *SLC26A7* Wildtyp den Verlust einer Proteinstruktur, die außerhalb der Membrandomäne liegt (roter Pfeil). Diese Region entspricht der STAS-Region in *SLC26A7*.

Die STAS-Region ist eine charakteristische Domäne der *SLC26*-Familie, die am C-terminalen Ende im Zytoplasma vorliegt und eine entscheidende Rolle bei der Ionen Austauschfunktion und Oberflächenexpression des Proteins spielt (vgl. 2.3.1) [12]. Durch den Verlust dieser membranstabilisierenden Region ist anzunehmen, dass die Proteinfunktionalität wesentlich beeinflusst wird. Das wurde bereits in *SLC26A3*, einem anderen Gen der *SLC26*-Genfamilie, experimentell gezeigt [137, 138]. Mutationen innerhalb der STAS-Region haben hier zum Verlust der Membranlokalisierung und verändertem Transportverhalten geführt [137]. Es wurden zwei Gruppen von Mutationen unterschieden: Während bei der Mutation  $\Delta Y526/7$  in *SLC26A3* eine Reduktion des  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches um 47% gegenüber dem Wildtyp und eine eingeschränkte Oberflächenexpression nachgewiesen wurde, konnte bei den Mutationen I544N, I675/6ins, und G702Tins in *SLC26A3* keine signifikante  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschaktivität oder Lokalisierung in der Membran mehr gezeigt werden [137]. Ursächlich hierfür ist bei den Mutationen I675/6ins und G702Tins in *SLC26A3* die Fehlfaltung der STAS-Domäne [137]. Interessanterweise kommt es durch  $\Delta Y526/7$  und I544N in *SLC26A3* zu keiner funktionellen Beeinträchtigung der STAS-Region selbst [137]. Es wird davon ausgegangen, dass die durch  $\Delta Y526/7$  und I544N verursachten Funktionseinschränkungen von *SLC26A3* durch eine gestörte Interaktion der STAS-Domäne mit anderen Proteinregionen von *SLC26A3* ausgelöst werden [137]. Ähnliche Beobachtungen wie bei *SLC26A3* konnten für die Mutation p.F631LfsX8 in *SLC26A7* gezeigt werden. Die Verkürzung von *SLC26A7* durch die Mutation p.F631LfsX8, bei der es verführt zum Abbruch der Translation kommt, führte

ebenfalls zu einem veränderten Expressionsverhalten [11]. Das mutierte Protein wurde nicht mehr in der Membran lokalisiert, sondern lag intrazellulär vor [11]. Ishii et al. konnten zusätzlich nachweisen, dass die Iod-Transportfunktion durch den Verlust der STAS-Domäne verloren geht [10]. Die in dieser Arbeit gefundene Mutation p.V478KfsX11 bewirkt einen früheren Abbruch des Proteins als p.F631LfsX8 und führt zum kompletten Wegfall der STAS-Region (Abbildung 43), wodurch vergleichbare Auswirkungen auf die Expression und Funktion stark anzunehmen sind. Darüber hinaus könnte der Funktionsverlust von SLC26A7 Folgen für Protein-Protein-Interaktionen haben. Dies wurde bislang nicht untersucht. Die Abbildung 26 zeigt die Analyse der Protein-Protein-Interaktionen für SLC26A7 von *String*. Dabei wird auf Grund von Textmining, einer Analyse von Textdaten, unter anderem eine Interaktion zu *SLC5A5* vorhergesagt. *SLC5A5/NIS* ist ein bereits bekanntes Kandidatengenen für Schilddrüsenhormonbiosynthesestörungen bei CH und Mutationen in *SLC5A5* können wie bei *SLC26A7* mit Struma-Bildung einher gehen (vgl. 2.2.4). Außerdem wurde bei Patienten mit mutierten *SLC5A5* ebenfalls eine erhöhte Blutserum TG-Konzentration gemessen [202]. Als  $\text{Na}^+/\text{I}^-$ -Symporter, der Iod aus der Blutbahn in die Thyreozyten transportiert, spielt NIS eine wichtige Funktion bei der Iod-Aufnahme (vgl. 2.1.3). SLC26A7 hingegen scheint, wie SLC26A4, am Iod-Transport nach extrazellulär mitzuwirken (vgl. 2.4.1). Da beide Transporter am Iod-Stoffwechsel der Schilddrüse beteiligt sind und eine Mutation in einem dieser beiden Gene ein klinisch ähnliches Krankheitsbild hervorruft, ist eine gegenseitige Interaktion durchaus denkbar. Für andere Mitglieder der *SLC26*-Genfamilie wurden bereits wichtige Protein-Protein-Interaktionen beschrieben [12, 14]. So aktivieren sich die STAS-Domäne von SLC26A3 und die R-Domäne von CFTR gegenseitig [12]. Der Verlust der STAS-Domäne von SLC26A7 könnte somit auch auf andere Proteine Einfluss haben und im Bezug zu SLC5A5 beispielsweise zu einer schweren Form der CH führen. Um diese Überlegung bestätigen, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig. Weiterhin werden durch die Mutation veränderte Spleißigenschaften in der Analyse von *Mutation Taster* (Abbildung 21) vorhergesagt. Die durchgeführte Spleißanalysen mit *ESE-finder* und *SpliceAID* bestärken diese Vermutung (Abbildung 22-24). Durch die Mutation p.F631LfsX8 fallen die Bindungsstellen für die Proteine Fox-1 und Fox-2, die das alternative Spleißen regulieren, weg. Fox-1 und Fox-2 spielen beispielsweise eine wichtige Rolle bei der Erythropoese [203]. Durch die Bindung von Fox-1 und Fox-2 an UGCAUG-Elementen des Proteins 4.1R kommt es zur Aktivierung eines Spleißprozesses, der zum Einschluss von Exon 16 führt, wodurch die Affinität des

Proteins 4.1R für Spektrin und Aktin erhöht wird [203]. Dieser Vorgang ist bedeutsam für die Differenzierung zu Erythrozyten [203]. Außerdem wird durch die Mutation p.F631LfsX8 eine neue Bindungsstelle für das Protein hnRNP DL gebildet. Das Protein hnRNP DL zeigt auch eine wichtige regulatorische Funktion beim alternativen Spleißen sowie der Expression von Genen [204]. Beispielsweise ist die Überexpression von hnRNP DL über die Regulation des CAMKV-Gens in APP/PS1-Mäusen, einem Mausmodell für Alzheimer, mit einer verbesserten kognitiven Leistungsfähigkeit assoziiert, während eine Herunterregulation zu Gedächtnisdefiziten führt [204]. Zusätzlich wird dem Protein hnRNP DL eine Rolle bei der Differenzierung von Muskelgewebe nachgewiesen [205]. Mutationen in hnRNP DL sind mit der Gliedergürteldystrophie, einer erblichen Muskelerkrankung assoziiert [205]. Um die genauen Auswirkungen der Spleißveränderungen durch p.F631LfsX8 auf das Protein SLC26A7 und seine Funktion zu verstehen, bedarf es jedoch *in vitro* Untersuchungen.

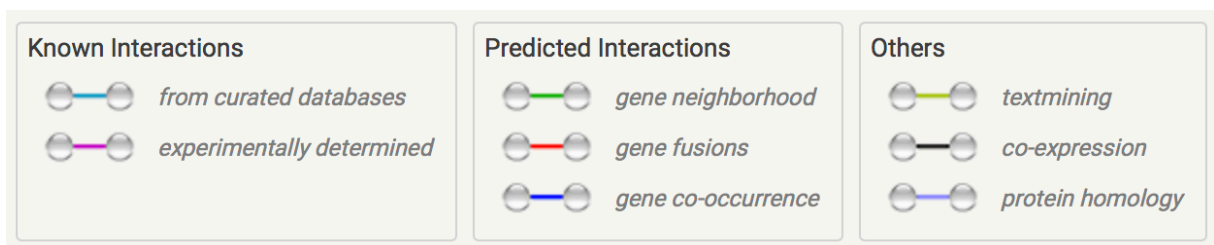
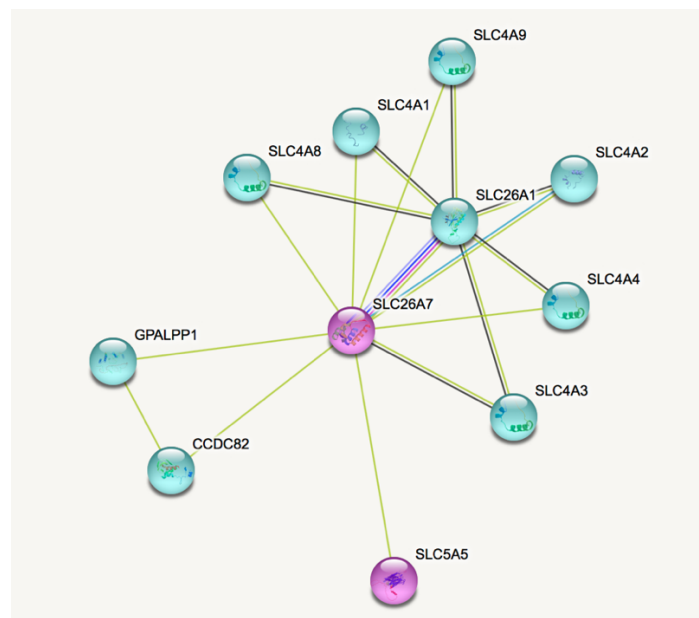


Abbildung 26: STRING Analyse über die Protein-Protein Interaktionen von SLC26A7 [195]. Mit dem Protein SLC26A7 werden zahlreiche Proteine anhand von Textdatenanalysen (Textmining/ hellgrüne Linie) in Verbindung gebracht. Aus den bisher bekannten Kandidatengenen für Schilddrüsenhormonbiosynthesestörungen wird für SLC5A5 eine Interaktion mit SLC26A7 vorhergesagt (lila Kugeln).

## Fazit

Zusammenfassend ist auf Grund der Ergebnisse der *in silico*-Analysen und der Vergleich von Untersuchungen ähnlicher Mutationen anzunehmen, dass die gefundene Mutation p.V478KfsX11 zum Funktionsverlust von SLC26A7 führt und bei der Patientin 3 ursächlich für die CH ist.

### 5.5 Noch nicht beschriebene Veränderungen in SLC26A7

Die Veränderungen c.796-123 C>A (Patient 6, vgl. 5.5.1) und c.1935+176 del T (Patient 7 und 15, vgl. 5.5.2) in den Intronbereichen von SLC26A7 sowie c.1259\_1267dupTGCTAATAC, p.Q423LinsLIQ in Exon 12 (Patient 19, vgl. 5.5.3) wurden in den Datenbanken bisher nicht hinterlegt. Innerhalb der untersuchten Kontrollen trat die Variante c.1935+176 del T einmal in heterozygoter Form auf. Um beurteilen zu können, ob es sich bei den Varianten um Polymorphismen oder krankheitsverursachende Mutationen handelt, wurden sie mit Hilfe von *in silico*-Analysen weiter untersucht.

#### 5.5.1 c.796-123 C>A

##### Patient 6

Die Patientin 6 ist das zweite Kind gesunder Eltern. Schilddrüsenerkrankungen sind in der Familie nicht bekannt. Sie kam nach komplikationsloser Schwangerschaft in der 38. Schwangerschaftswoche per Sectio bei Beckenendlage zur Welt. Postpartal wurde die Patientin kurzzeitig bei anhaltender auffälliger Atmung und kurzzeitigem O<sub>2</sub>-Bedarf intensivmedizinisch betreut. In den ersten Tagen nach Geburt zeigte sie sich schläfrig, trank nicht ausreichend und wurde über eine Sonde zusätzlich ernährt. Im Neugeborenen Screening fiel ein erhöhter TSH-Wert von 383mU/l (NW: 0,2 - 4,2mU/l) auf. Die Diagnose CH wurde am 6. Lebenstag mit einem exzessiv erhöhten TSH-Wert von 741mU/l und einem erniedrigten fT4-Wert von 0,4 ng/dl (NW: 0.9-1.7ng/dl) bestätigt. Zudem war der TG-Wert mit 372ng/ml (NW: bis 50ng/ml) erhöht. Bei der sonographischen Untersuchung der Schilddrüse stellte sich eine orthotope Struma dar. Die L-Thyroxin Therapie wurde mit 50µg eingeleitet. Darunter konnte ein adäquater TSH-Abfall und eine klinische Verbesserung erreicht werden, sodass die Dosis angepasst wurde. In den Kontrolluntersuchungen zeigte sich unter Therapie eine normale Entwicklung der Patientin. Die molekulargenetische Untersuchung der Kandidatengene auf CH aufgrund einer Hormonbiosynthesestörung zeigte keine ursächlichen Mutationen.

## Lokalisation der Variante

Die heterozygote Variante c.796-123 C>A der Patientin 6 ist im Intronbereich zwischen Exon 7 und Exon 8 lokalisiert.

## Mutation-und Spleißanalyse

Die *in silico*-Analyse von *Mutation Taster* bezeichnet die VUS c.796-123 C>A als Polymorphismus. Jedoch wird nicht ausgeschlossen, dass sich der Basenaustausch durch die Veränderung des Spleißverhaltens auf das Protein und damit auf seine Funktion auswirken kann (Abbildung 27).

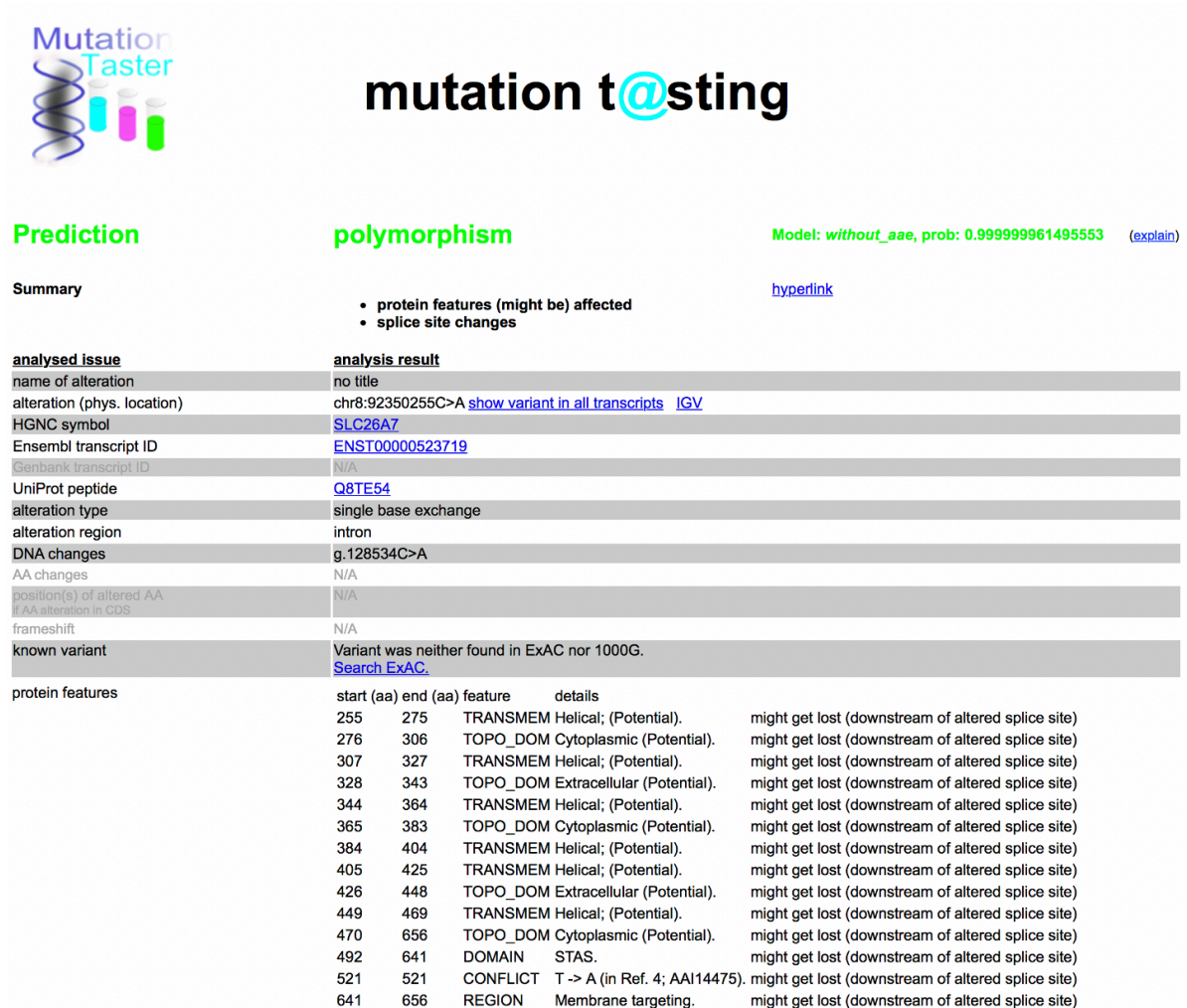


Abbildung 27: *Mutation Taster* Vorhersage zu c.796-123 [186]. Die Veränderung c.796-123 C>A wird als Polymorphismus eingestuft.

Die Ergebnisse der Spleißanalysen von *ESEfinder* und *SpliceAID* verstärken die Annahme, dass sich das Spleißen durch den Basenaustausch von C zu A im Intronbereich ändern könnte.

Der Vergleich der Splice Sites mit der Wildtypsequenz in der Analyse von *ESEfinder* zeigt den fast vollständigen Wegfall einer Verzweigungsstelle (branch site) an der Position der Transition (Abbildung 28). Die Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein einer Verzweigungsstelle reduziert sich von 1.93 auf 0.06. Der Einfluss einer neu entstandenen Verzweigungsstelle kann durch die Wahrscheinlichkeit von 0.1 als gering angesehen werden. Zudem kommt es zum Verlust zweier Bindungsstellen für die regulatorischen SRProteine SRSF2 und SRSF6, wie die Abbildung 29 zeigt.

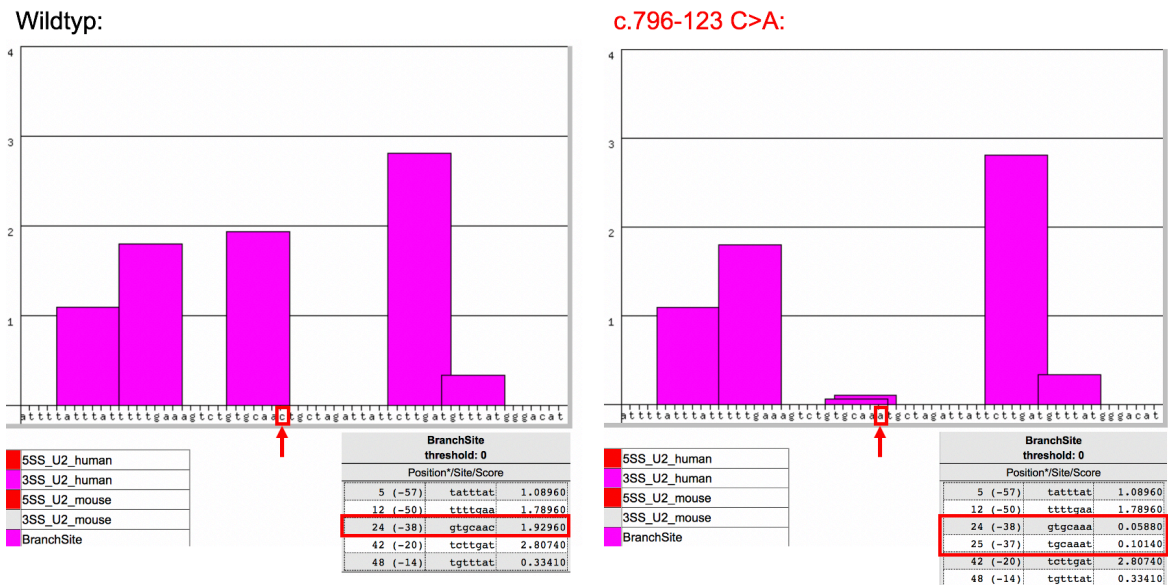
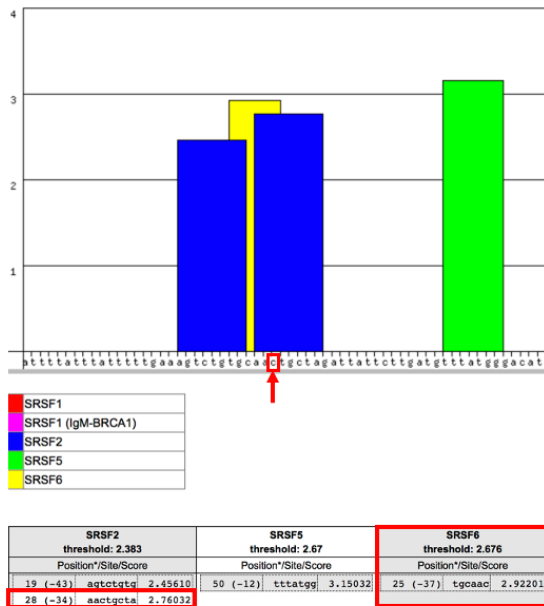


Abbildung 28: *ESEfinder*-Analyse der Splice Sites: Vergleich *SLC26A7* Wildtyp mit c.796-123 C>A [188]. Durch den Basenaustausch von Cytosin zu Adenin in c.796-123 C>A (roter Pfeil) kommt es zu einer starken Reduzierung der Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen der BranchSite an Position 24 bis 38 (rote Markierung). Weiterhin entsteht überlappend zu dieser mit sehr niedriger Wahrscheinlichkeit eine neue Bindungsstelle für eine Verzweigungsstelle (rote Markierung), sodass insgesamt mit einem Wegfall der Bindungsstellen für BranchSites durch die Veränderung c.796-123 C>A zu rechnen ist.

Wildtyp:



c.796-123 C>A:

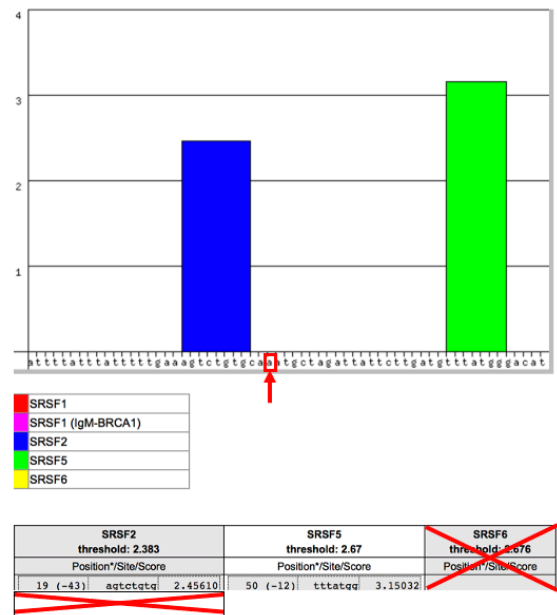
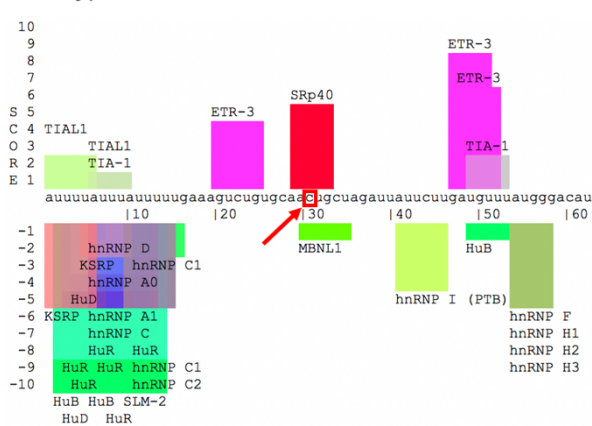


Abbildung 29: ESEfinder-Analyse der Bindungsstellen von SRProteinen: Vergleich *SLC26A7* Wildtyp mit c.796-123 C>A [188]. Durch den Basenaustausch von Cytosin zu Adenin in c.796-123 C>A (roter Pfeil) kommt zum Verlust der Bindungsstellen für die Proteine SRSF2 (blauer Balken/ rote Markierung) und SRSF6 (gelber Balken/ rote Markierung).

Die *SpliceAID*-Analyse stellt ebenfalls Unterschiede bei Bindungsstellen für regulatorische Spleißproteine von c.796-123 C>A verglichen mit dem Wildtyp dar. Die Bindestellen für die Proteine SRp40 und MBNL1 entfallen, während neue Bindestellen für die Proteine SLM-2 und Sam 68 entstehen (Abbildung 30).

Wildtyp:



c.796-123 C>A:

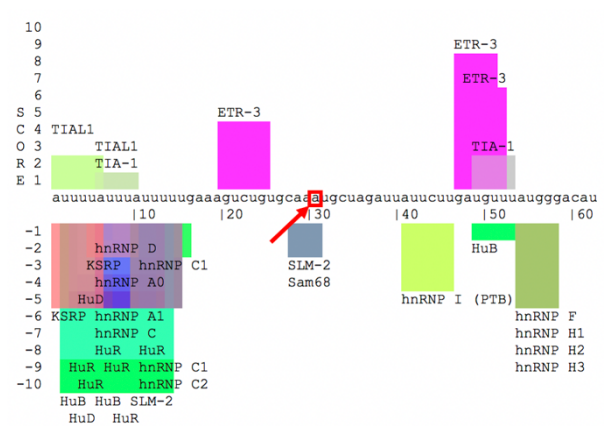


Abbildung 30: *SpliceAID*-Analyse: Vergleich *SLC26A7* Wildtyp mit c. 796-123 C>A [189]. Durch den Basenaustausch von Cytosin zu Adenin in c.796-123 C>A (roter Pfeil) kommt es zum Verlust der Bindungsstellen für die Proteine SRp40 (roter Balken) und MBNL1 (hellgrüner Balken) und es entsteht eine neue Bindungsstelle für die Proteine SLM-2 und Sam68 (grauer Balken).

### *Beurteilung der Variante*

Die Variante c.796-123 C>A lag bei einer Patientin in heterozygoter Form vor. Diese Veränderung im Intronbereich von *SLC26A7* wurde zuvor weder in den Datenbanken noch unter den untersuchten Kontrollen beobachtet. Die Analyse von *Mutation Taster* identifiziert diesen Basenaustausch als Polymorphismus. Es wird angenommen, dass während der Transkription Änderungen im Spleißverhalten vorkommen. Die Analysen von *ESEfinder* und *SpliceAID* zeigen den Verlust einer branch site und der Bindungsstellen für SRProteine sowie Veränderungen bei der Bindung von regulatorischen Spleißproteinen. Änderungen und Auswirkungen des Spleißverhalten durch Varianten werden von den Datenbanken häufig übersehen oder bei Veränderungen ohne Leserasterverschiebung als unbedeutend gewertet [206]. Intronbereiche spielen eine wichtige Rolle für das Spleißen sowie für die Regulation der Genexpression [207, 208]. Bisher sind jedoch nur wenige krankheitsverursachende Spleißmutationen in Intronbereichen beschrieben worden [206]. Darunter auch Mutationen innerhalb der Branch site, die sowohl zum Überspringen von Exonen sowie zur Retention von Intronbereichen führen können [206]. Die Variante c.796-123 C>A kann demzufolge trotz der Annahme eines Polymorphismus durch das veränderte Spleißverhalten Auswirkungen auf das Protein *SLC26A7* haben. Um die genaue Bedeutung dieser Spleißveränderungen durch c.796-123 C>A zu klären, müssen experimentelle *in vitro* Untersuchungen durchgeführt werden (vgl. 5.7.1).

#### **5.5.2 c.1935+176 del T**

##### *Patientin 7 und Patientin 15*

Die Patientin 7 fiel im Neugeborenen Screening durch einen hohen TSH-Wert von 299mU/l (NW: 0,2-4,2 mU/l) mit erhöhtem TG-Wert von 100ng/ml (NW: bis 50 ng/ml) auf. Sonographisch wurde eine Schilddrüse nachgewiesen, sodass von einer CH auf Grund eines Hormonbiosynthesedefekts auszugehen ist. Die Patientin wird seit Geburt mit L-Thyroxin behandelt.

Bei der Patientin 15 lag der TSH-Wert im Screening bei 149mU/l (NW: 0,2-4,2 mU/l). Dieser stieg in der Kontrolluntersuchung auf 397,65mU/l an. Der gemessene fT4-Wert von 0,26pg/ml (NW: 0.9-1.7 ng/dl) und der fT3-Wert von 1,25pg/ml (NW: 2.3-4.9 pg/ml) bestätigten die Diagnose der CH. Die Blutserumkonzentration von TG betrug 63,2ng/ml (NW: bis 50 ng/ml). Es erfolgte eine unmittelbare L-Thyroxin Substitution,

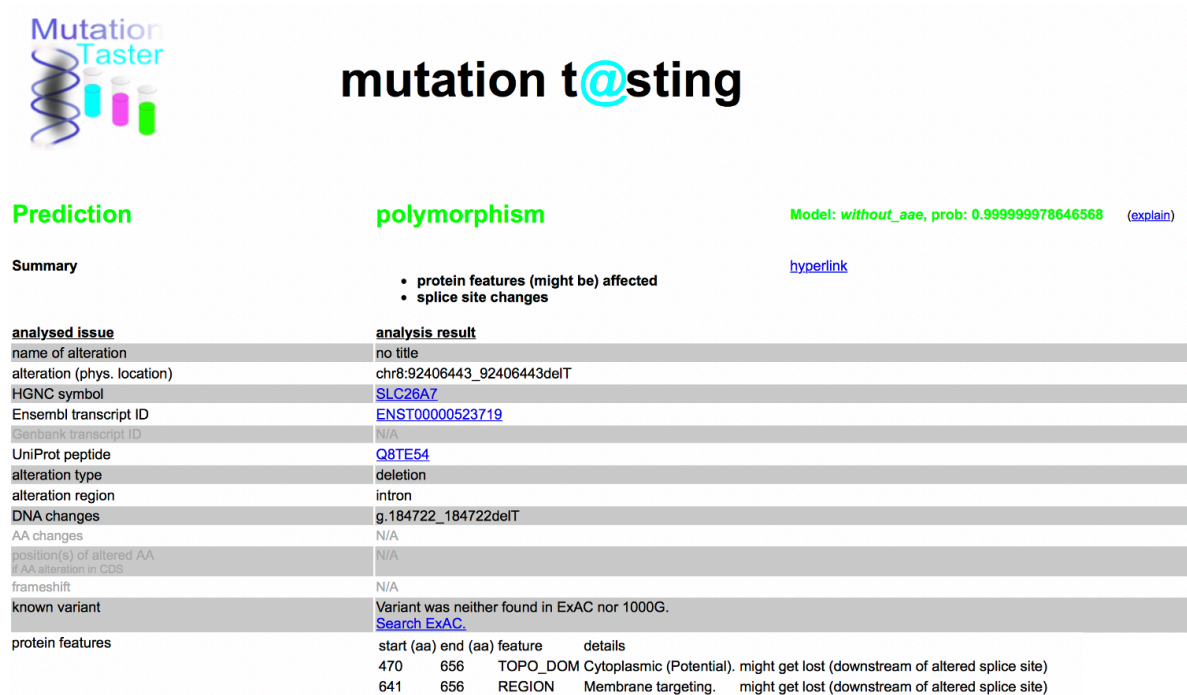
worunter sich eine gute Entwicklung des Kindes zeigte. Sonographisch stellte sich die Schilddrüse nicht vergrößert dar.

### Lokalisation der Variante

Die VUS c.1935+176 del T befindet sich im Intronbereich zwischen Exon 19 und Exon 20.

### Mutations-und Spleißanalyse

Die Analyse von *Mutation Taster* prognostiziert die Deletion der Base Thymin an der Position c.1935+176 als Polymorphismus. Zusätzlich werden Veränderungen im Spleißen angenommen, wodurch auch die Proteinfunktion beeinflusst werden könnte (Abbildung 31).



**Mutation Taster**

## mutation t@sting

**Prediction** **polymorphism** Model: *without\_aae*, prob: 0.999999978646568 [\(explain\)](#)

[hyperlink](#)

**Summary**

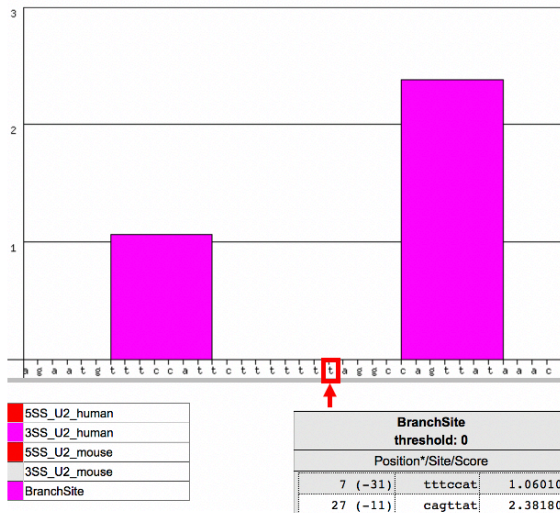
- protein features (might be) affected
- splice site changes

analysed issue	analysis result												
name of alteration	no title												
alteration (phys. location)	chr8:92406443_92406443delT												
HGNC symbol	<a href="#">SLC26A7</a>												
Ensembl transcript ID	<a href="#">ENST00000523719</a>												
Genbank transcript ID	N/A												
UniProt peptide	<a href="#">Q8TE54</a>												
alteration type	deletion												
alteration region	intron												
DNA changes	g.184722_184722delT												
AA changes	N/A												
position(s) of altered AA if AA alteration in CDS	N/A												
frameshift	N/A												
known variant	Variant was neither found in ExAC nor 1000G. <a href="#">Search ExAC.</a>												
protein features	<table border="1"> <thead> <tr> <th>start (aa)</th> <th>end (aa)</th> <th>feature</th> <th>details</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>470</td> <td>656</td> <td>TOPO_DOM</td> <td>Cytoplasmic (Potential). might get lost (downstream of altered splice site)</td> </tr> <tr> <td>641</td> <td>656</td> <td>REGION</td> <td>Membrane targeting. might get lost (downstream of altered splice site)</td> </tr> </tbody> </table>	start (aa)	end (aa)	feature	details	470	656	TOPO_DOM	Cytoplasmic (Potential). might get lost (downstream of altered splice site)	641	656	REGION	Membrane targeting. might get lost (downstream of altered splice site)
start (aa)	end (aa)	feature	details										
470	656	TOPO_DOM	Cytoplasmic (Potential). might get lost (downstream of altered splice site)										
641	656	REGION	Membrane targeting. might get lost (downstream of altered splice site)										

Abbildung 31: *Mutation Taster* Vorhersage zu c.1935+176 del T [186]

Die Spleißanalyse von *ESEfinder* zeigt keine Veränderungen durch die Variante c.1935+176 del T im Vergleich zum Wildtyp. Die Splice Sites sowie die Bindungsstellen der SRProteine bleiben gleich (Abbildung 32 und Abbildung 33).

Wildtyp:



c.1935+176 del T:

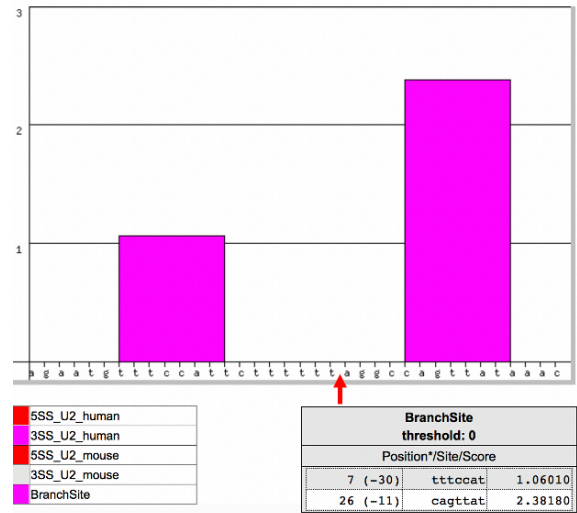
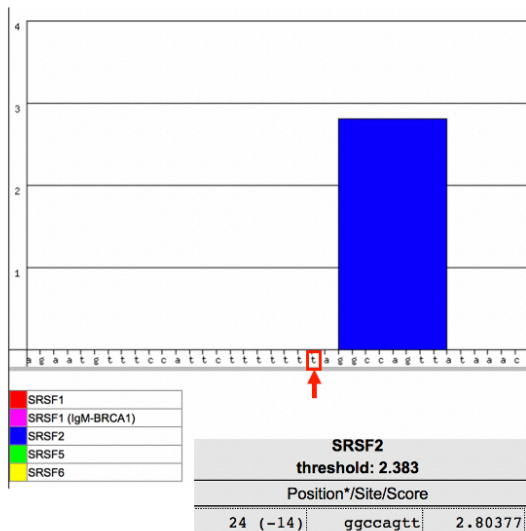


Abbildung 32: *ESEfinder*-Analyse der Splice Sites: Vergleich *SLC26A7* Wildtyp mit c.1935+176 del T [188]. Durch die Deletion der Base Thymin in c.1935+176 del T (roter Pfeil) kommt es zu keiner Veränderung der Splice Sites gegenüber dem *SLC26A7* Wildtyp.

Wildtyp:



c.1935+176 del T:

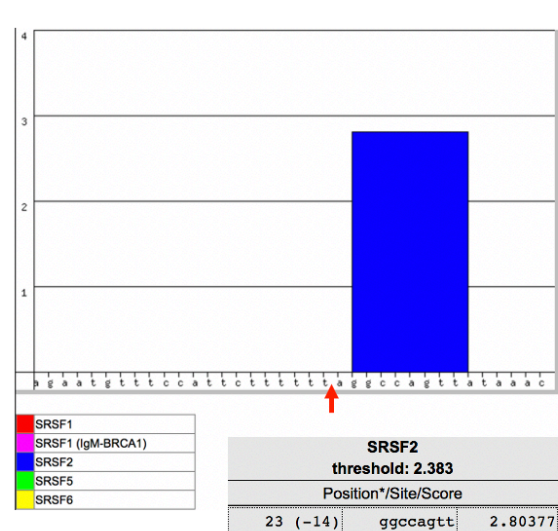
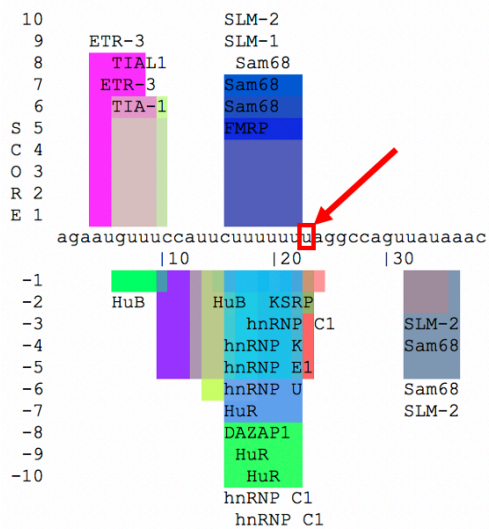


Abbildung 33: *ESEfinder*-Analyse der Bindungsstellen von SRProteinen: Vergleich *SLC26A7* Wildtyp mit c.1935+176 del T [188]. Durch die Deletion der Base Thymin in c.1935+176 del T (roter Pfeil) kommt es zu keiner Veränderung der Bindungsstellen für SRProteine gegenüber dem *SLC26A7* Wildtyp.

Eine Änderung der Spleißeigenschaften durch die Variante c.1935+176 del T wird jedoch von der Analyse *SpliceAID* angezeigt (Abbildung 34). Hier ist der Verlust zahlreicher Bindungsstellen für Spleißproteine festzustellen. So entfällt beispielsweise die Bindung der Proteine SLM-2, SLM-1, hnRNP K, hnRNP E1. Die Bindung durch das Protein hnRNP C2 entsteht neu durch c.1935+176 del T.

## Wildtyp:



## c.1935+176 del T:

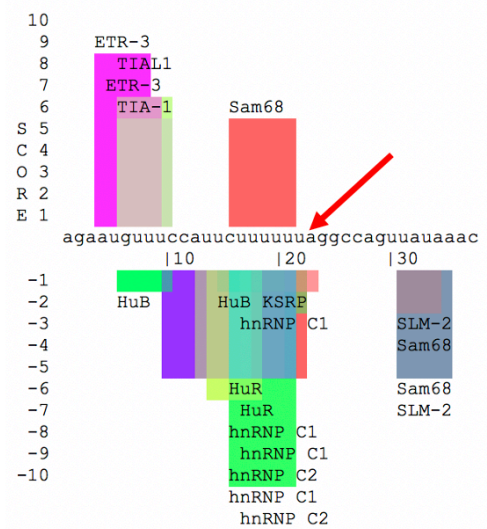


Abbildung 34: *SpliceAID*-Analyse: Vergleich *SLC26A7* Wildtyp mit c.1935+176 del T [189]. Durch die Deletion der Base Thymin in c.1935+176 del T (roter Pfeil) kommt es zum Verlust der Bindungsstellen für die Proteine SLM-2, SLM-1, hnRNP K, hnRNP E1 und zur neuen Bindungsstelle für das Protein hnRNP C2.

### Beurteilung der Variante

Die Variante c.1935+176 del T trat bei zwei Patienten sowohl homozygot als auch heterozygot auf. Diese Veränderung im Intronbereich ist in den Datenbanken nicht hinterlegt. Innerhalb der 20 durchgeführten Kontrollen wurde diese Variante ebenfalls detektiert. Sie kam bei einer Kontrolle als heterozygote Veränderung vor. Die Analyse von *Mutation Taster* stuft die Variante c.1935+176 del T als Polymorphismus ein, wobei sich Proteineigenschaften durch andere Splicesites verändern könnten. Eine Analyse der Splicesites sowie der SRProtein-Bindungsstellen hingegen zeigt keine Veränderungen durch c.1935+176 del T. Lediglich die weitere Untersuchung mit *SpliceAID* zeigt ein abweichendes Bindungsmuster von Proteinen, die das Spleißen beeinflussen können. Insgesamt zeigen die durchgeführten *in silico*-Analysen, sowie die Häufigkeit innerhalb der untersuchten Patienten und Kontrollen, dass es sich bei der Variante c.1935+176 del T sehr wahrscheinlich um einen Polymorphismus handelt. Das sollte gegebenenfalls in den Datenbanken ergänzt werden. Um ein verändertes Spleißverhalten beweisen zu können, muss dieses beispielweise anhand von *in vitro* Untersuchungen gezeigt werden (vgl. 5.7.1).

### 5.5.3 c.1259\_1267dupTGCTAATAC, p.Q423LinsLIQ

#### Patient 19

Der Patient mit der Duplikation c.1259\_1267dupTGCTAATAC ist das 3. Kind einer fünfköpfigen Familie. Die Schwangerschaft sowie die Geburt verliefen komplikationslos. Während der Schwangerschaft wurde die Mutter auf Grund einer Jodmangelstruma mit 200µg/d Jodid behandelt. Das Geburtsgewicht mit 3450g und die Körperlänge mit 54cm lagen im Normbereich. Die Geburt erfolgte in der 40.Schwangerschaftswoche. Im Neugeborenenenscreening fiel der Patient durch einen erhöhten TSH von 202mU/l (NW: 0,2-4,2 mU/l) auf, der in der Kontrolluntersuchung 2 Tage später bis auf 405mU/l anstieg. Trotz leicht erhöhtem fT3-Wert von 5,8pg/ml (NW: 2,3-4,9 pg/ml) bestätigte der fT4-Wert von 0,5ng/dl (NW: 0,9-1,7 ng/dl) die Diagnose einer CH. Klinisch zeigte der Patient eine angeborene Struma und eine leichte Makroglossie. Es wurde eine L-Thyroxin Therapie begonnen, worunter der Patient sich normal entwickelte. Im 11. Lebensjahr wurde ein Auslassversuch durchgeführt. Im Rahmen des Auslassversuches entwickelte der Patient erneut eine mit Struma einhergehende Hypothyreose, sodass man die L-Thyroxin Substitution fortsetzte. Darunter zeigt der Patient eine euthyreote Stoffwechsellage.

In der Familie ist nur bei der Mutter eine Schilddrüsenerkrankung bekannt, die wegen einer Jodmangelstruma behandelt wird. Die Duplikation wird von den Eltern vererbt, die beide heterozygote Träger sind (Abbildung 16). Der ältere Bruder ist ebenfalls heterozygoter Träger. Die Schwester ist nicht Trägerin der Mutation.

#### Lokalisation der Variante

Das Duplikat c.1259\_1267dupTGCTAATAC in Exon 12 kodiert für eine Stelle im Protein, die im Bereich der vorletzten Transmembrandomäne liegt, wie die Grafiken von *Ensembl* und *Phobius* veranschaulichen (Abbildung 35 und 36).

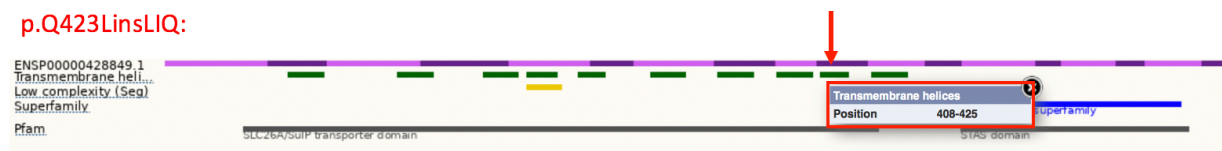


Abbildung 35: *Ensembl*-Darstellung: Protein Domänen für *SLC26A7*, *ENST00000523719.5* und Position der Duplikation c.1259\_1267dupTGCTAATAC, p.Q423LinsLIQ (roter Pfeil/ rote Markierung) [159].

## Wildtyp:

FT	TOPO_DOM	1	65	CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	66	93	
FT	TOPO_DOM	94	98	NON CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	99	115	
FT	TOPO_DOM	116	144	CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	145	165	
FT	TOPO_DOM	166	170	NON CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	171	191	
FT	TOPO_DOM	192	202	CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	203	220	
FT	TOPO_DOM	221	225	NON CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	226	245	
FT	TOPO_DOM	246	256	CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	257	277	
FT	TOPO_DOM	278	303	NON CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	304	327	
FT	TOPO_DOM	328	347	CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	348	367	
FT	TOPO_DOM	368	378	NON CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	379	397	
FT	TOPO_DOM	398	401	CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	402	424	
FT	TOPO_DOM	425	443	NON CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	444	469	
FT	TOPO_DOM	470	656	CYTOPLASMIC.
//				

## p.Q423LinsLIQ:

FT	TOPO_DOM	1	65	CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	66	93	
FT	TOPO_DOM	94	98	NON CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	99	115	
FT	TOPO_DOM	116	144	CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	145	165	
FT	TOPO_DOM	166	170	NON CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	171	191	
FT	TOPO_DOM	192	202	CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	203	220	
FT	TOPO_DOM	221	225	NON CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	226	245	
FT	TOPO_DOM	246	256	CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	257	277	
FT	TOPO_DOM	278	303	NON CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	304	327	
FT	TOPO_DOM	328	347	CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	348	367	
FT	TOPO_DOM	368	378	NON CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	379	397	
FT	TOPO_DOM	398	403	CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	404	427	
FT	TOPO_DOM	428	446	NON CYTOPLASMIC.
FT	TRANSMEM	447	472	
FT	TOPO_DOM	473	659	CYTOPLASMIC.
//				

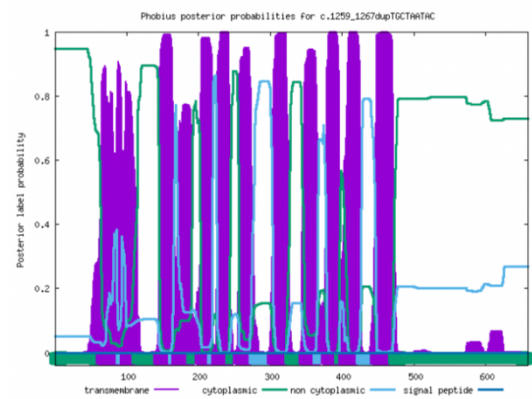
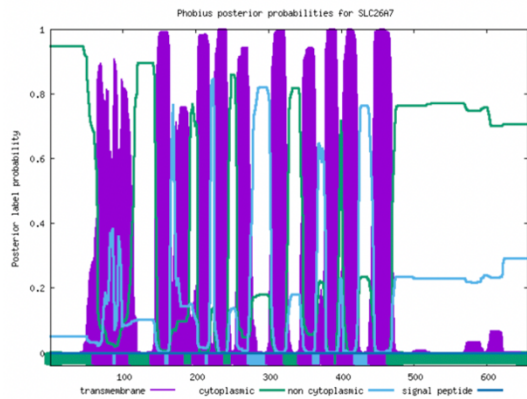


Abbildung 36: Phobius- Analyse: Analyse der Transmembrandomänen und Signalpeptide von *SLC26A7* Wildtyp und p.Q423LinsLIQ. Bei p.Q423LinsLIQ verlängert sich die rot markierte, zytoplasmatische Domäne und Transmembrandomäne [201].

## Mutations- und Spleißanalyse

Die Mutationsanalyse von *Mutation Taster* stuft die Duplikation als Polymorphismus ein. Es wird jedoch auch beschrieben, dass es durch den Einbau der Basen zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz kommt und die das Spleißen beeinflussen könnte. Diese Veränderung des Proteins, hätte vermutlich Einfluss auf die Funktion (Abbildung 37).



# mutation t@sting

## Prediction

## polymorphism

Model: *complex\_aae*, prob: 0.99999951873454 [\(explain\)](#)

### Summary

- amino acid sequence changed
- protein features (might be) affected
- splice site changes

[hyperlink](#)

analysed issue	analysis result																																
name of alteration	no title																																
alteration (phys. location)	chr8:92365177_92365178insTGCTAATAC																																
HGNC symbol	<a href="#">SLC26A7</a>																																
Ensembl transcript ID	<a href="#">ENST00000523719</a>																																
Genbank transcript ID	N/A																																
UniProt peptide	<a href="#">Q8TE54</a>																																
alteration type	insertion																																
alteration region	CDS																																
DNA changes	c.1267_1268insTGCTAATAC cDNA.1539_1540insTGCTAATAC g.143456_143457insTGCTAATAC																																
AA changes	insertion of more than 2 AA -421L Score: -, -421I Score: -, -421L Score: - <a href="#">explain score(s)</a>																																
position(s) of altered AA if AA alteration in CDS	421																																
frameshift	no																																
known variant	Variant was neither found in ExAC nor 1000G. <a href="#">Search ExAC.</a>																																
protein features	<table border="1"> <thead> <tr> <th>start (aa)</th> <th>end (aa)</th> <th>feature</th> <th>details</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>405</td> <td>425</td> <td>TRANSMEM</td> <td>Helical; (Potential). lost</td> </tr> <tr> <td>426</td> <td>448</td> <td>TOPO_DOM</td> <td>Extracellular (Potential). might get lost (downstream of altered splice site)</td> </tr> <tr> <td>449</td> <td>469</td> <td>TRANSMEM</td> <td>Helical; (Potential). might get lost (downstream of altered splice site)</td> </tr> <tr> <td>470</td> <td>656</td> <td>TOPO_DOM</td> <td>Cytoplasmic (Potential). might get lost (downstream of altered splice site)</td> </tr> <tr> <td>492</td> <td>641</td> <td>DOMAIN</td> <td>STAS. might get lost (downstream of altered splice site)</td> </tr> <tr> <td>521</td> <td>521</td> <td>CONFLICT</td> <td>T -&gt; A (in Ref. 4; AA114475). might get lost (downstream of altered splice site)</td> </tr> <tr> <td>641</td> <td>656</td> <td>REGION</td> <td>Membrane targeting. might get lost (downstream of altered splice site)</td> </tr> </tbody> </table>	start (aa)	end (aa)	feature	details	405	425	TRANSMEM	Helical; (Potential). lost	426	448	TOPO_DOM	Extracellular (Potential). might get lost (downstream of altered splice site)	449	469	TRANSMEM	Helical; (Potential). might get lost (downstream of altered splice site)	470	656	TOPO_DOM	Cytoplasmic (Potential). might get lost (downstream of altered splice site)	492	641	DOMAIN	STAS. might get lost (downstream of altered splice site)	521	521	CONFLICT	T -> A (in Ref. 4; AA114475). might get lost (downstream of altered splice site)	641	656	REGION	Membrane targeting. might get lost (downstream of altered splice site)
start (aa)	end (aa)	feature	details																														
405	425	TRANSMEM	Helical; (Potential). lost																														
426	448	TOPO_DOM	Extracellular (Potential). might get lost (downstream of altered splice site)																														
449	469	TRANSMEM	Helical; (Potential). might get lost (downstream of altered splice site)																														
470	656	TOPO_DOM	Cytoplasmic (Potential). might get lost (downstream of altered splice site)																														
492	641	DOMAIN	STAS. might get lost (downstream of altered splice site)																														
521	521	CONFLICT	T -> A (in Ref. 4; AA114475). might get lost (downstream of altered splice site)																														
641	656	REGION	Membrane targeting. might get lost (downstream of altered splice site)																														

Abbildung 37: *Mutation Taster* Vorhersage zu c.1259\_1267dupTGCTAATAC [186]. Die Veränderung c.1259\_1267dupTGCTAATAC wird als Polymorphismus eingestuft.

Eine weitere Mutationsanalyse wurde mit Hilfe von *Polyphen* durchgeführt. *Polyphen* prognostiziert, dass der Austausch der Aminosäure Glutamin durch Leucin an dieser Position (Aminosäure 423) wahrscheinlich krankheitsverursachend ist, weil es sich hier um eine hoch konservierte Aminosäure handelt (Abbildung 38). Ebenso krankheitsverursachend werden die Verschiebungen der Aminosäuren an Position 425 von Arginin zu Isoleucin und 426 von Asparginsäure zu Glutamin gewertet (Abbildung 38). Diese Analyse konnte jedoch nicht für die gesamte Duplikation LIQ (Leucin, Isoleucin und Glutamin) durchgeführt werden, da nur die Veränderung einer einzelnen Aminosäure überprüft werden kann.

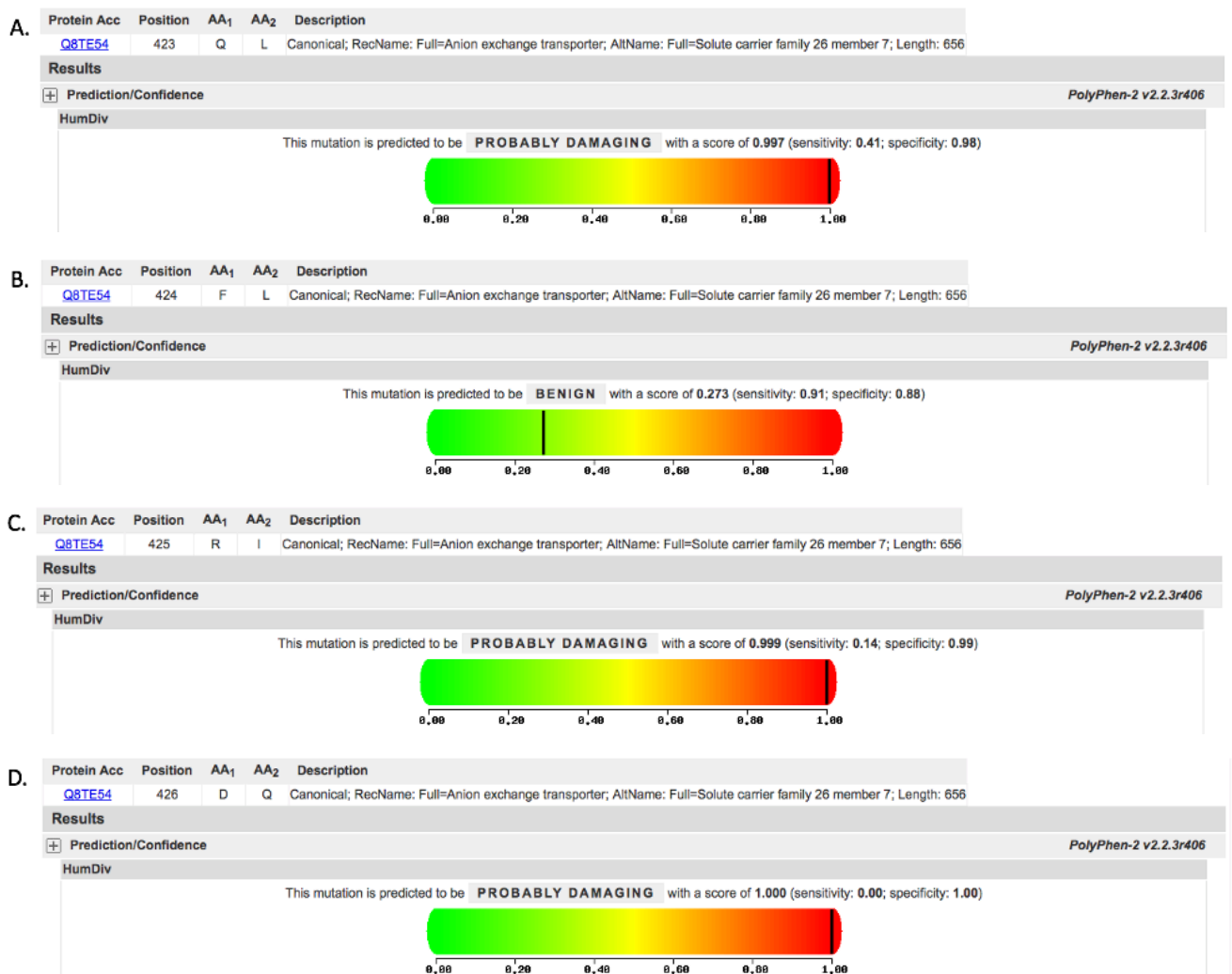
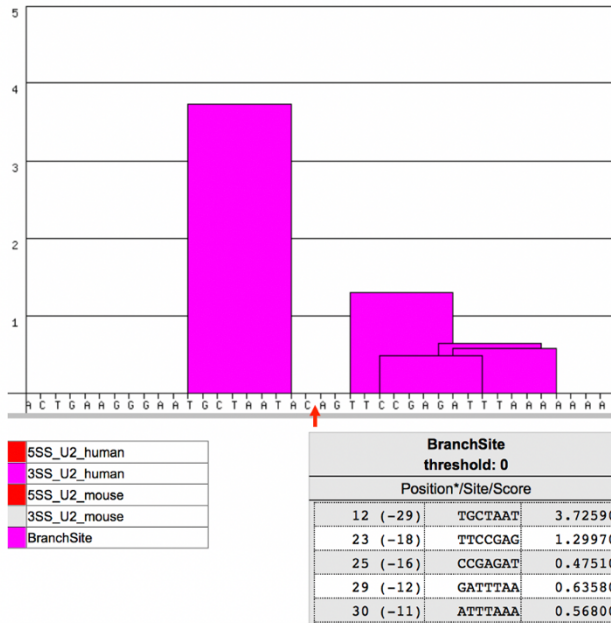


Abbildung 38: Polyphen-Analyse zu p.Q423L, p.F424L, p.R425I, p.D426Q [209].

- A. Die Variante p.Q423L wird als wahrscheinlich krankheitsverursachend eingestuft mit einem Score von 0,997 (Sensitivität:0,41; Spezifität:0,98)
- B. Die Variante p.F424L wird als wahrscheinlich benigne eingestuft mit einem Score von 0,273 (Sensitivität:0,91; Spezifität:0,88)
- C. Die Variante p.R425I wird als wahrscheinlich krankheitsverursachend eingestuft mit einem Score von 0,999 (Sensitivität:0,14; Spezifität:0,99)
- D. Die Variante p.D426Q wird als wahrscheinlich krankheitsverursachend eingestuft mit einem Score von 1 (Sensitivität:0,00; Spezifität:1)

Die Veränderung im Spleißverhalten wurden mit *ESEfinder* untersucht. Durch die Insertion entstehen zusätzliche Verzweigungsstellen (branch sites), die für die Bildung des Spliceosoms eine Rolle spielen. Die Wahrscheinlichkeiten für das Vorhandensein der beiden neuen Verzweigungsstellen liegen bei 0.19 und 3.73, wie in Abbildung 39 dargestellt. Zudem entstehen durch die veränderte Basensequenz neue Bindungsstellen für die SRProteine SRSF2 und SRSF5 (Abbildung 40).

Wildtyp:



c.1259\_1267dupTGCTAATAC:

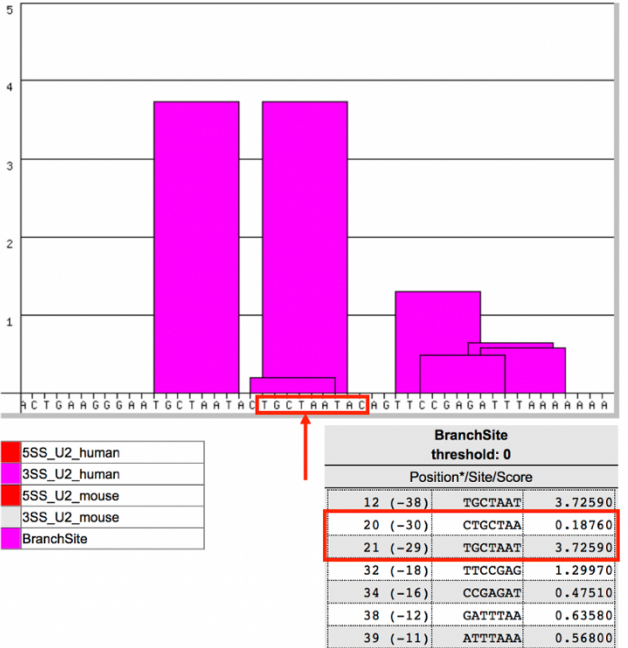
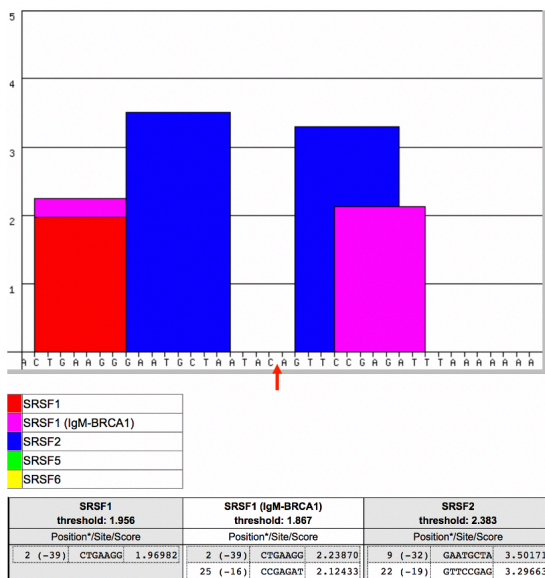


Abbildung 39: ESEfinder-Analyse der Splice Sites: Vergleich SLC26A7 Wildtyp mit c.1259\_1267dupTGCTAATAC [188]. Durch die Duplikation der Basen TGCTAATAC (roter Pfeil) kommt es zu zwei neue Bindungsstellungen für BranchSites (lila Balken), wobei die Wahrscheinlichkeit, dass eine Änderung der BranchSite an Position 20 resultiert mit 0,19 sehr gering ist (rote Markierung).

Wildtyp:



c.1259\_1267dupTGCTAATAC:

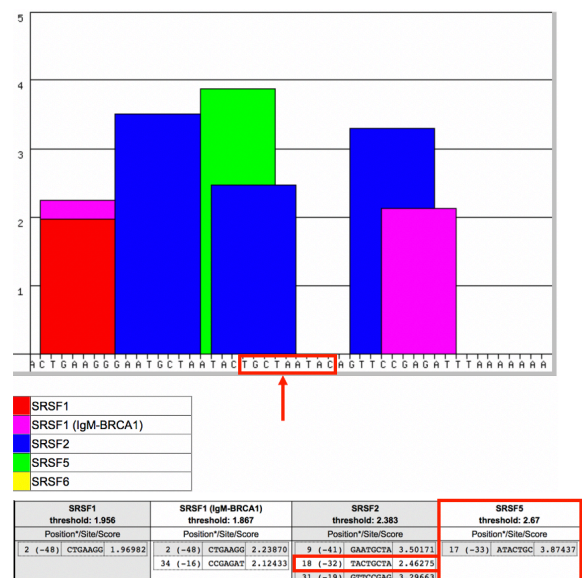


Abbildung 40: ESEfinder-Analyse der Bindungsstellen von SRProteinen: Vergleich SLC26A7 Wildtyp mit c.1259\_1267dupTGCTAATAC [188]. Durch die Duplikation der Basen TGCTAATAC (roter Pfeil) entstehen zwei neue Bindungsstellen für die Proteine SRSF2 (blauer Balken/ rote Markierung) und SRSF5 (grüner Balken/ rote Markierung).

Die weitere Spleißanalyse mit dem *in silico*-Programm SpliceAID zeigt ebenfalls die Entstehung neuer Bindungsstellen für Proteine, die an der Spleißregulation beteiligt

sind. Durch die Duplikation können erneut die Proteine SLM-2, Sam68, QKI und zusätzlich auch die Proteine SRp40 und MBNL1 binden (Abbildung 41).

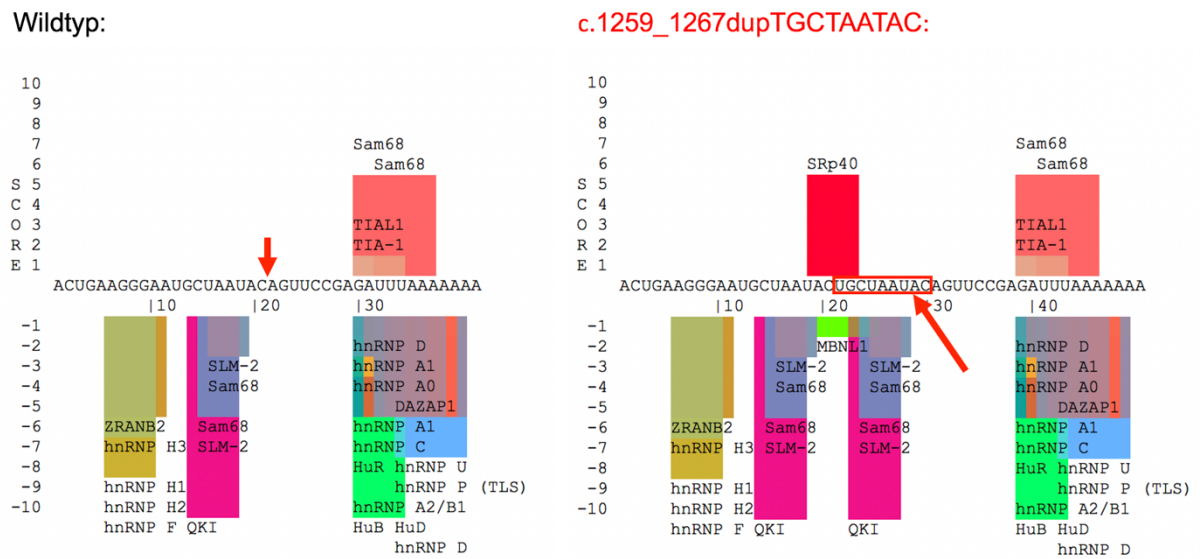


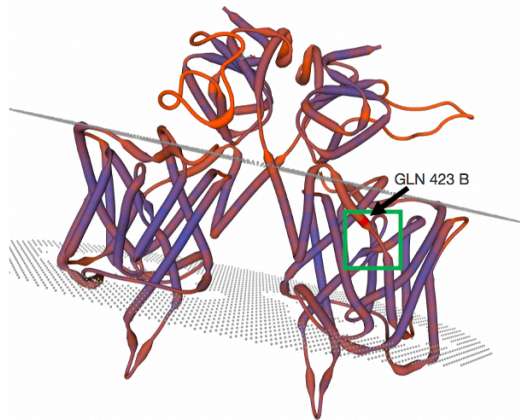
Abbildung 41: *SpliceAID*-Analyse: Vergleich *SLC26A7* Wildtyp mit c.1259\_1267dupTGCTAATAC [189]. Durch die Duplikation der Basen TGCTAATAC (roter Pfeil) entsteht erneut eine Bindungsstelle für die Proteine SLM-2, Sam68, QKI (blau, grau und rosafarbiger Balken) und eine neue Bindungsstelle für das Protein MBNL1 (hellgrüner Balken).

### Beurteilung der Variante

Bei Patient 19 wurde im Exon 12 von *SLC26A7* die Duplikation c.1259\_1267dupTGCTAATAC, p.Q423LinsLIQ gefunden. Bei dieser Veränderung kommt es zur Insertion von 9 Basenpaaren, die bisher weder in den Datenbanken noch in den Kontrollen aufgetreten ist. Die Mutationsanalyse *Mutation Taster* interpretiert diese VUS als Polymorphismus, da es zu keiner Verschiebung des Leserasters kommt. Dieser Analyse widersprechen die Untersuchungen von *Polyphen*. Die Analyse über den Austausch der Aminosäuren an Position 423, 425 und 426 zeigen, dass an dieser Position hoch konservierte Aminosäuren vorliegen und eine Änderung der ursprünglichen Aminosäuren wahrscheinlich schädliche Auswirkungen auf das Protein *SLC26A7* hat (Abbildung 38). Diese Analyse kann jedoch nicht den Einfluss der gesamten Duplikation interpretieren, da immer nur einzelne Aminosäuren untersucht werden können. Auf Grund des unveränderten Leserasters sind die Effekte der Variante c.1259\_1267dupTGCTAATAC, die innerhalb der Transmembrandomäne lokalisiert ist, schwer interpretierbar. Mit Hilfe des *in silico*-Programms *SWISS Model* wurde deshalb eine 3-D-Proteinstruktur modelliert (Abbildung 42). Im Vergleich zum Wildtyp lässt sich eine Abweichung in Form einer verlängerten Transmembranstruktur erkennen. Durch die Veränderung der Transmembrandomänenstruktur sind

Auswirkungen auf die Anionentranslokationswege und somit auf die Proteinfunktion vorstellbar (vgl 2.3.1).

Wildtyp:



p.Q423LinsLIQ:

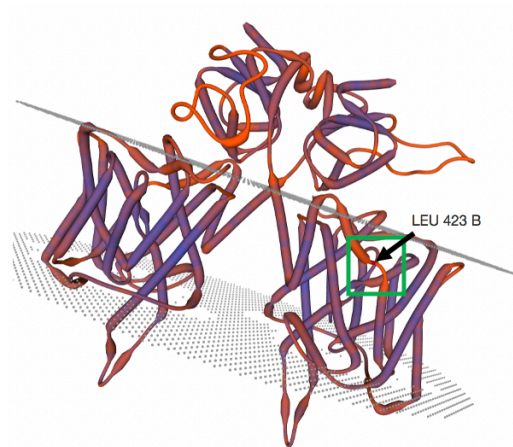


Abbildung 42: SWISS-MODEL: Vergleich *SLC26A7* Wildtyp mit p.Q423LinsLIQ [193]. Der grüne Kasten markiert im 3-D Modell die Stelle der Mutation. Dabei lässt sich in p.Q423LinsLIQ gegenüber dem *SLC26A7* Wildtyp eine verlängerte Proteinstruktur in diesem Bereich erkennen.

Hinzu kommt, dass sich die chemischen Eigenschaften der zusätzlich eingebauten Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Glutamin von denen der *SLC26A7* Wildtyp-Aminosäuren an den Positionen 423, 425 und 426 unterscheiden (siehe Tabelle 13). Durch diese Unterschiede beispielsweise in Polarität der Aminosäuren sind Effekte auf die Proteinstruktur anzunehmen.

Position der AS	AS, WT	AS, p.L483P	Chem.Eigenschaften (WT → p.Q423LinsLIQ)
423	Glutamin	Leucin	polar → unpolar
424	Phenylalanin	Leucin	unpolar → unpolar
425	Arginin	Isoleucin	basisch → unpolar
426	Asparaginsäure	Glutamin	sauer → polar

Tabelle 13: Vergleich der chemischen Eigenschaften der Aminosäuren 423-426 des *SLC26A7* Wildtyp mit der Variante *SLC26A7* p.L483P.

Außerdem befindet sich die Variante p.Q423LinsLIQ in unmittelbarer Nähe einer hochkonservierten Region der *SLC26*-Genfamilie (vgl.2.3.1). Mutationen innerhalb dieser Region können zum Funktionsverlust führen und ursächlich für Erkrankungen sein [14, 143]. So wurden die Mutationen p.N425D und p.L483P, die innerhalb dieser Region lokalisiert sind, in *SLC26A2* bei Patienten mit Achondrogenese Typ IB und Atelosteogenesis als krankheitsverursachend beschrieben [143]. Dadurch wird die Annahme, dass p.Q423LinsLIQ einen negativen Effekt auf die Eigenschaften von *SLC26A7* hat, bestärkt.

Zusätzlich geben die *ESEfinder* und *SpliceAID* Analysen von c.1259\_1267dupTGCTAATAC einen großen Effekt auf das Spleißen an. Es entsteht zum einen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine neue branch site, zum anderen kommt es zu neuen Bindungsstellen für die SRProteine 2 und 5 sowie weiterer Proteine, die das Spleißen beeinflussen. Die neuen Bindungsstellen können im Rahmen des alternativen Spleißens zu Veränderungen der Proteinfunktion führen. Beim Prostatakarzinom wurde beispielsweise die, durch einen Single Nukleotid Polymorphismus entstandene, neue Bindungsstelle für das SRProtein 5 (SRp40) im *KLF6*-Gen mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert [210]. Um herauszufinden, ob durch c.1259\_1267dupTGCTAATAC krankheitsverursachende *SLC26A7* Isoformen entstehen und wie sich diese auf die Funktion auswirkt, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Die Ergebnisse der Analysen lassen insgesamt annehmen, dass sich die Variante c.1259\_1267dupTGCTAATAC auf Grund der Seltenheit, der Lokalisation, der Änderung der chemischen Eigenschaften und dem veränderten Spleißen negativ auf die Eigenschaften des Proteins *SLC26A7* auswirkt. Trotz der Einstufung als Polymorphismus durch *Mutation Taster*, sprechen andere Analysen für einen negativen Effekt. Es ist zu beachten, dass Veränderungen, die zu einem veränderten Spleißverhalten führen, häufig bei Protein basierten Analyseprogrammen fehlinterpretiert werden [206]. Inwieweit sich das Protein durch die Variante in seinen Eigenschaften verändert und ob das Spleißen einen Funktionsverlust bewirkt, muss durch weiterführende Experimente geklärt werden (vgl.5.7.1).

## **5.6 Ursächliche Mutationen im *SLC26A7*-Gen bei CH**

*SLC26A7* wurde neu im Zusammenhang mit angeborener Hypothyreose beschrieben [9]. Mittels WES wurde das Gen bei CH- Patienten detektiert und Untersuchungen mit *Slc26a7*- Knockoutmäusen zeigen, dass der Verlust dieses Gens zu Hypothyreose

und Struma führt [9-11, 175, 177]. *Slc26a7*-Knockoutmäusen leiden zudem unter einer renalen tubulären Azidose sowie Veränderungen der Magensäureproduktion [15]. Diese Funktionseinschränkungen konnten bei menschlichen Individuen bisher nicht beobachtet und nachgewiesen werden [10, 11]. Die genaue Funktion sowie Lokalisation von SLC26A7 in der Schilddrüse ist umstritten, wobei es sich wahrscheinlich um einen Iodid-Transporter handelt [10, 11]. Vor Beginn dieser Arbeit wurden 7 Mutationen in *SLC26A7* ursächlich für CH beschrieben (Abbildung 43) [9-11, 175, 177]. Das klinische Bild dieser Patienten zeigte sich gegenüber den Knockout-Mäusen variabler, wobei die meisten Patienten hohe TSH-Werte und eine Struma aufwiesen [9-11, 175, 177]. Zusätzlich beschriebene Besonderheiten waren ein deutlich erhöhter TG-Wert sowie heterozygote Mutationen in *SLC26A4* und *TG* neben den ursächlichen *SLC26A7*-Mutationen [9, 10].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die gezielte Auswahl der Patienten eine weitere, neue Mutation in *SLC26A7* detektiert werden. Die hier gefundene Mutation p.F631LfsX8 führt zur Verschiebung des Leserasters, wodurch es zum verfrühten Abbruch der Translation kommt. Das verkürzte Protein, falls es überhaupt exprimiert wird, wird als krankheitsverursachend prognostiziert. Untersuchungen von Ishii et al. zeigen, dass durch den Verlust der STAS-Domäne die Oberflächenexpression verloren geht und die Transportfunktion verändert ist (Abbildung 43) [10]. Somit scheint diese Mutation in *SLC26A7* ursächlich für die CH der Patientin zu sein, auch wenn die genaue Funktion von SLC26A7 in der Schilddrüse noch nicht abschließend geklärt ist. Die Diagnose der Patientin wurde anhand eines stark erhöhten TSH-Wertes bei Geburt gestellt. Zusätzlich fiel ein hoher TG-Wert von 704 mU/l (NW: 0,2-4,2 mU/L) sowie eine hyperperfundierte, vergrößerte Schilddrüse auf. Mutationen in weiteren Kandidatengenen wurden bei der Patientin ausgeschlossen. Der Phänotyp der Patientin mit der homozygoten Mutation p.F631LfsX8 entspricht somit dem klinischen Bild der meisten CH-Patienten mit *SLC26A7*- Mutationen [9-11, 175, 177]. Im Gegensatz zu Cangul et al. wurde eine polygenetische Komponente von *SLC26A7* nicht beobachtet [11].

Es gilt weiterhin zu klären, ob die durch VUS c.1259\_1267dupTGCTAATAC entstandene SLC26A7-Variante ursächlich für die CH des Patienten ist. Trotz eines gleichbleibenden Leserasters geht die Duplikation mit einem Austausch der Aminosäuren und somit Veränderungen der chemischen Eigenschaften einher. Zudem werden Veränderungen im Spleißverhalten angenommen. Eine Auswirkung

auf die Proteinfunktion ist somit stark anzunehmen. Bisher wurden jedoch noch keine Spleißmutationen für *SLC26A7* beschrieben.

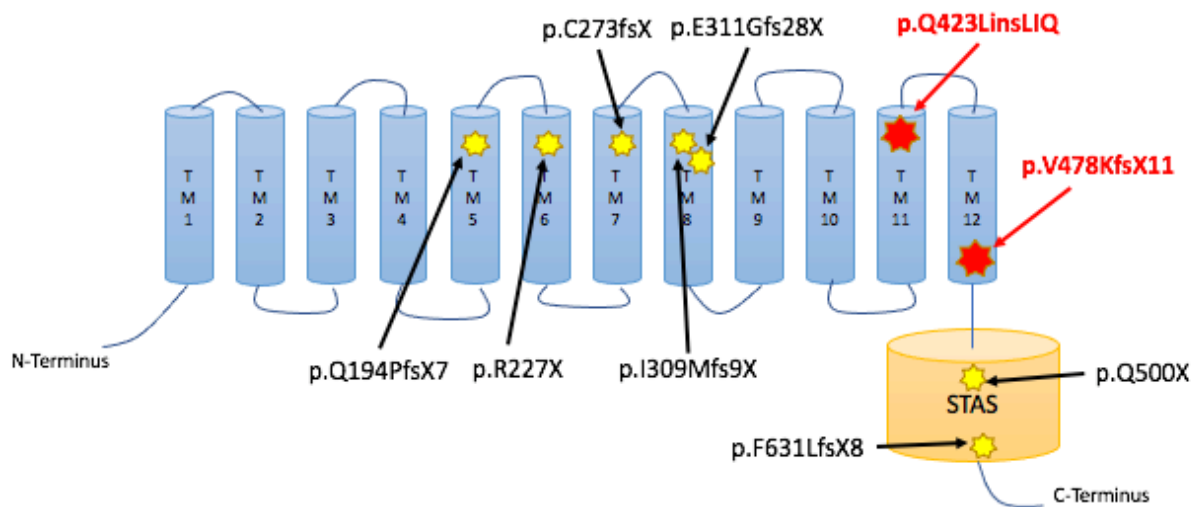


Abbildung 43: Bisher publizierte *SLC26A7*- Mutationen von Patienten mit CH mit der neu gefundenen Mutation p.V478KfsX11 und der VUS p.Q423LinsLIQ am *SLC26A7*-Proteinmodell; modifiziert nach Ishii et al. [10]

## 5.7 Ausblick

### 5.7.1 Untersuchungen des Spleißverhaltens

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Veränderungen detektiert, die bisher nicht in den Datenbanken beschrieben wurden. Bei zwei dieser Varianten wird in *in silico*-Analysen ein verändertes Spleißverhalten gegenüber dem Wildtyp vorhergesagt. Um zu prüfen, ob die Veränderung des Spleißens den Funktionsverlust von *SLC26A7* bewirkt und somit krankheitsverursachend ist, bedarf es experimenteller Untersuchungen. Hierbei wäre besonders interessant die Variante c.1259\_1267dupTGCTAATAC in *SLC26A7* zu untersuchen, da diese Veränderung innerhalb des codierenden Bereichs vorliegt und die alleinige Basenverschiebung von Glutamin zu Leucin als krankheitsverursachend vorhergesagt wird. Um nachzuweisen, ob durch die VUS Splice-Varianten von *SLC26A7* entstehen, kann aus der Schilddrüse extrahierte mRNA der Patienten durch RT-PCR (Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) zu cDNA umgeschrieben werden und nach Amplifizierung und Sequenzierung der spezifischen Sequenz können Veränderungen der Sequenz gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden. Durch Einbringen der cDNA in einen

Vektor und Expression des Proteins in Bakterien, die dann das zugehörige Protein synthetisieren, können strukturelle Proteinanalysen angeschlossen werden.

Eine weitere Methode zur Untersuchung des Spleißverhaltens, wenn kein Schilddrüsengewebe der Patientin zur Verfügung gestellt werden kann, ist die Verwendung eines Spleißvektors. Hierfür wird zuerst der genomische Abschnitt des mutierten Exons mit flankierenden Introns und Exons amplifiziert und aufgereinigt, um ihn anschließend in einen geeigneten Spleißvektor (z.B. RHCglo von Singh und Cooper) einzufügen. Für das Einschleusen des PCR-Produkts in den Vektor ist es wichtig, dass der Vektor und das Insert die gleichen Schnittstellen aufweisen. Der RHCglo- Vektor enthält beispielsweise die Schnittstellen BamHI und XhoI, diese können durch den Einsatz entsprechender Primer in das PCR-Produkt eingefügt werden. Anschließend muss der Vektor mit dem mutierten Exon zur Amplifizierung in Bakterienzellen transformiert werden, um ausreichend Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen (z.B. HeLa-Zellen) zu transferieren. In den transfizierten Zellen wird nun während einer Inkubationszeit der mutierte Genabschnitt transkribiert. Zur Untersuchung des neu entstandenen Transkripts wird die RNA aus diesen Zellen isoliert, mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben und nach Amplifizierung und Aufreinigung sequenziert. Durch die Untersuchung der cDNA-Sequenz können die Auswirkungen der Mutation auf das Spleißverhalten im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden.

### **5.7.2 Aufnahme von SLC26A7 in die Routinediagnostik**

Es müssen weitere Patienten mit ursächlichen *SLC26A7*-Mutationen detektiert und charakterisiert werden, um das Verständnis der Rolle von *SLC26A7* auf die Schilddrüsenhormonbiosynthese zu verbessern. Bisher wurden nur wenige Patienten, die einen klinisch variablen Verlauf aufweisen, auf *SLC26A7* untersucht [9-11, 175, 177]. Dabei wäre auch die Bedeutung von erhöhten TG-Werten genauer zu untersuchen. Weiterhin gilt es bei Patienten mit *SLC26A7*-Mutationen den Verlauf und die Therapie, der sich bisher als variabel erwies, zu beobachten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass mit Hilfe der unter 4.1.1 erstellten Auswahlkriterien CH-Patienten mit hoher Wahrscheinlichkeit eine *SLC26A7*-Mutation detektiert werden konnte. Die zielgerichtete Patientenauswahl fand einen Patienten mit einer ursächlichen *SLC26A7*-Mutation c.1432\_1433delGT, p.V478KfsX11 sowie drei weitere bisher unbekannte Veränderungen c.796-123 C>A, c.1259\_1267dupTGCTAATAC (p.Q423LinsLIQ), c.1935+176 del T in *SLC26A7*,

darunter ein prospektiv ausgewählter Patient. Der Patient mit der *SLC26A7*-Mutation c.1432\_1433delGT, p.V478KfsX11 zeigte neben dem erhöhten TSH-Wert einen stark erhöhten TG-Wert und eine Struma. Die klinischen Befunde entsprechen bereits beschriebenen Beobachtungen bei CH-Patienten mit *SLC26A7*-Mutationen [9-11, 175, 177].

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Notwendigkeit einer Untersuchung von *SLC26A7* bei der molekulargenetischen Diagnostik einer CH aufgrund einer Hormonbiosynthesestörung, vor allem bei Patienten mit Struma und TG-Erhöhung. Die aktuelle europäische Guideline von 2021 empfiehlt bereits die Aufnahme des neu entdeckten Gens *SLC26A7* als Teil der genetischen Diagnostik [52].

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen einer molekulargenetischen Untersuchung von CH-Patienten mittels WES wurde 2018 das Gen *SLC26A7* erstmals im Zusammenhang mit CH beschrieben [9].

Die CH ist mit einer Inzidenz von ca. 1:2000-4000 die häufigste angeborene endokrinologische Erkrankung [1, 53]. Der Mangel an Schilddrüsenhormonen kann schwerwiegende Folgen für die Entwicklung des Kindes haben, die durch eine frühzeitige Therapie verhindert werden können [1, 2]. Ursachen für die CH sind Anlagestörungen und Hormonbiosynthesestörungen [4].

*SLC26A7* gehört zur *SLC26*-Genfamilie, die für Anionentransporter kodieren [12]. Untersuchungen zu *SLC26A7* zeigen, dass es im Menschen am stärksten in der Schilddrüse exprimiert wird und dass der Knockout von *Slc26a7* in der Maus mit einer Hypothyreose und Struma einhergeht [11, 160]. Die genaue Funktion von *SLC26A7* in der Schilddrüse ist jedoch noch unklar, wobei eine Funktion als Iodid-Transporter wahrscheinlich ist [10, 11].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Patienten mit einer Schilddrüsenhormonbiosynthesestörung auf Mutationen in *SLC26A7* untersucht. Diese hatten eine normale oder vergrößerte Schilddrüse, sowie 50% von ihnen eine erhöhte Blutserum-TG-Konzentration. So wurden aus insgesamt 665 Hypothyreose-Patienten mit Hormonbiosynthesestörungen, die im Labor der AG [REDACTED], Molekulare Pädiatrische Endokrinologie untersucht wurden, 20 Patienten ausgewählt. Davon waren 16 Kandidaten bereits molekulargenetisch voruntersucht und hatten keine ursächlichen Mutationen in den bereits bekannten Kandidatengenomen. Vier weitere Patienten, die zuvor nicht hinsichtlich der bisher bekannten Kandidatengene untersucht wurden, wurden ebenfalls analysiert. Es wurde zur Analyse des *SLC26A7*-Gens ein PCR- und Sequenzierungsprotokoll etabliert und die Sequenzen mit Hilfe von *in silico*-Analysen untersucht und diskutiert. Alle Protokolle sind sehr gut reproduzierbar, weswegen die Untersuchung von *SLC26A7* auch in die molekulargenetische Routinediagnostik aufgenommen werden kann.

Insgesamt wurden bei den 20 untersuchten Patienten eine neue ursächliche *SLC26A7*-Mutation, die im Laufe dieser Arbeit publiziert wurde [211], drei bisher noch nicht beschriebene Veränderungen sowie 22 Polymorphismen detektiert.

Die Mutation c.1432\_1433delGT, p.V478KfsX11 einer CH-Patientin führt sehr wahrscheinlich aufgrund der Verschiebung des Leserasters zu einem verfrühten

Stopp-Codon. Durch den vorzeitigen Abbruch der Translation würde die STAS-Domäne nicht exprimiert. Die STAS-Domäne ist eine für die *SLC26*-Genfamilie charakteristische Region, die essentiell für die Funktion und Oberflächenexpression des Proteins ist [136]. Folglich geht der Verlust dieser Domäne mit Veränderungen der Funktion einher und *SLC26A7* wird nicht an der Oberfläche exprimiert [10]. Da die Patientin keine Mutationen in den bisher bekannten Kandidatengen aufwies, scheint diese Mutation ursächlich für die CH zu sein.

Von den drei bisher nicht beschriebenen Veränderungen handelt sich bei der Variante c.1935+176 del T wahrscheinlich um einen Polymorphismus. Für die beiden anderen VUS c.796-123 C>A und c.1259\_1267dupTGCTAATAC, p.Q423LinsLIQ werden Veränderungen im Spleißverhalten vorhergesagt, die sich auf die Struktur und Funktion des Proteins auswirken können. Um dies nachzuweisen, bedarf es weiterer experimenteller Untersuchungen. Die Variante c.1259\_1267dupTGCTAATAC, p.Q423LinsLIQ scheint trotz des gleichbleibenden Leserasters einen negativen Effekt auf das *SLC26A7* Protein zu haben, da die Aminosäure Glutamin an der Position 423 stark konserviert ist und hier ein alleiniger Basenaustausch als pathogen vorhergesagt wird.

Diese Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bei CH-Patienten mit Verdacht auf eine Schilddrüsenhormonbiosynthesestörung eine Untersuchung des *SLC26A7*-Gens empfehlenswert ist. *SLC26A7* sollte als weiteres Kandidatengen in die molekulargenetische Routinediagnostik für Schilddrüsenhormonbiosynthesestörungen aufgenommen werden.

## Literaturverzeichnis

1. Ford, G. and S.H. LaFranchi, *Screening for congenital hypothyroidism: a worldwide view of strategies*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2014. **28**(2): p. 175-87.
2. Soliman, A.T., et al., *Linear growth and neurodevelopmental outcome of children with congenital hypothyroidism detected by neonatal screening: A controlled study*. Indian J Endocrinol Metab, 2012. **16**(4): p. 565-8.
3. Alm, J., et al., *Incidence of congenital hypothyroidism: retrospective study of neonatal laboratory screening versus clinical symptoms as indicators leading to diagnosis*. Br Med J (Clin Res Ed), 1984. **289**(6453): p. 1171-5.
4. LaFranchi, S.H., *Approach to the diagnosis and treatment of neonatal hypothyroidism*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(10): p. 2959-67.
5. Corbetta, C., et al., *A 7-year experience with low blood TSH cutoff levels for neonatal screening reveals an unsuspected frequency of congenital hypothyroidism (CH)*. Clin Endocrinol (Oxf), 2009. **71**(5): p. 739-45.
6. Zdraveska, N., et al., *Genetics of Gland-in-situ or Hypoplastic Congenital Hypothyroidism in Macedonia*. Front Endocrinol (Lausanne), 2020. **11**: p. 413.
7. Nicholas, A.K., et al., *Comprehensive Screening of Eight Known Causative Genes in Congenital Hypothyroidism With Gland-in-Situ*. J Clin Endocrinol Metab, 2016. **101**(12): p. 4521-4531.
8. Worth, C., et al., *Thyroid scintigraphy differentiates subtypes of congenital hypothyroidism*. Arch Dis Child, 2021. **106**(1): p. 77-79.
9. Zou, M., et al., *Molecular Analysis of Congenital Hypothyroidism in Saudi Arabia: SLC26A7 Mutation Is a Novel Defect in Thyroid Dysmorphogenesis*. J Clin Endocrinol Metab, 2018. **103**(5): p. 1889-1898.
10. Ishii, J., et al., *Congenital goitrous hypothyroidism is caused by dysfunction of the iodide transporter SLC26A7*. Commun Biol, 2019. **2**: p. 270.
11. Cangul, H., et al., *Homozygous loss-of-function mutations in SLC26A7 cause goitrous congenital hypothyroidism*. JCI Insight, 2018. **3**(20).
12. Alper, S.L. and A.K. Sharma, *The SLC26 gene family of anion transporters and channels*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(2-3): p. 494-515.
13. Wemeau, J.L. and P. Kopp, *Pendred syndrome*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2017. **31**(2): p. 213-224.
14. Mount, D.B. and M.F. Romero, *The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 710-21.
15. Xu, J., et al., *Deletion of the chloride transporter slc26a7 causes distal renal tubular acidosis and impairs gastric acid secretion*. J Biol Chem, 2009. **284**(43): p. 29470-9.
16. Schmidt R. F., L.F., Heckmann M., *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 31. Auflage (2010) ed. 1936, Heidelberg: Springer, S. 446-449.
17. Moog, N.K., et al., *Influence of maternal thyroid hormones during gestation on fetal brain development*. Neuroscience, 2017. **342**: p. 68-100.
18. Schünke M., S.E., Schumacher U., Voll M., Wesker K., *PROMETHEUS, LernAtlas der Anatomie*. 4. Auflage (2015) ed. Kopf, Hals und Neuroanatomie. 2005, Stuttgart: Thieme.
19. Welsch U., D.T., *Lehrbuch Histologie*. 4. Auflage (2014) ed. 2002, München: Elsevier, S.434-439.

20. Williams, G.R. and J.H.D. Bassett, *Thyroid diseases and bone health*. J Endocrinol Invest, 2018. **41**(1): p. 99-109.
21. Huffmeier, U., H.U. Tietze, and A. Rauch, *Severe skeletal dysplasia caused by undiagnosed hypothyroidism*. Eur J Med Genet, 2007. **50**(3): p. 209-15.
22. Henrichs, J., et al., *Maternal thyroid function during early pregnancy and cognitive functioning in early childhood: the generation R study*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(9): p. 4227-34.
23. Korevaar, T.I., et al., *Association of maternal thyroid function during early pregnancy with offspring IQ and brain morphology in childhood: a population-based prospective cohort study*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2016. **4**(1): p. 35-43.
24. Lavado-Autric, R., et al., *Early maternal hypothyroxinemia alters histogenesis and cerebral cortex cytoarchitecture of the progeny*. J Clin Invest, 2003. **111**(7): p. 1073-82.
25. Grosse, S.D. and G. Van Vliet, *Prevention of intellectual disability through screening for congenital hypothyroidism: how much and at what level?* Arch Dis Child, 2011. **96**(4): p. 374-9.
26. Chaker, L., et al., *Hypothyroidism*. Lancet, 2017. **390**(10101): p. 1550-1562.
27. Loh, H.H., et al., *Association between subclinical hypothyroidism and depression: an updated systematic review and meta-analysis*. BMC Psychiatry, 2019. **19**(1): p. 12.
28. Koyyada, A. and P. Orsu, *Role of hypothyroidism and associated pathways in pregnancy and infertility: Clinical insights*. Tzu Chi Med J, 2020. **32**(4): p. 312-317.
29. Gammage, M. and J. Franklyn, *Hypothyroidism, thyroxine treatment, and the heart*. Heart, 1997. **77**(3): p. 189-90.
30. Dutta, D., et al., *Thyroid Symptomatology across the Spectrum of Hypothyroidism and Impact of Levothyroxine Supplementation in Patients with Severe Primary Hypothyroidism*. Indian J Endocrinol Metab, 2019. **23**(3): p. 373-378.
31. Ellervik, C., et al., *Hypothyroidism and Kidney Function: A Mendelian Randomization Study*. Thyroid, 2020. **30**(3): p. 365-379.
32. Fariduddin, M.M. and N. Bansal, *Hypothyroid Myopathy*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
33. Shahid, M.A., M.A. Ashraf, and S. Sharma, *Physiology, Thyroid Hormone*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
34. Cheng, S.Y., J.L. Leonard, and P.J. Davis, *Molecular aspects of thyroid hormone actions*. Endocr Rev, 2010. **31**(2): p. 139-70.
35. Brent, G.A., *Mechanisms of thyroid hormone action*. J Clin Invest, 2012. **122**(9): p. 3035-43.
36. Mendoza, A. and A.N. Hollenberg, *New insights into thyroid hormone action*. Pharmacol Ther, 2017. **173**: p. 135-145.
37. van der Deure, W.M., R.P. Peeters, and T.J. Visser, *Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters*. J Mol Endocrinol, 2010. **44**(1): p. 1-11.
38. Lopez-Espindola, D., et al., *Mutations of the thyroid hormone transporter MCT8 cause prenatal brain damage and persistent hypomyelination*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(12): p. E2799-804.
39. Sandler, B., et al., *Thyroxine-thyroid hormone receptor interactions*. J Biol Chem, 2004. **279**(53): p. 55801-8.

40. Morte, B., et al., *Thyroid hormone regulation of gene expression in the developing rat fetal cerebral cortex: prominent role of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV pathway*. *Endocrinology*, 2010. **151**(2): p. 810-20.
41. Niwattisaiwong, S., K.D. Burman, and M. Li-Ng, *Iodine deficiency: Clinical implications*. *Cleve Clin J Med*, 2017. **84**(3): p. 236-244.
42. Nazeri, P., et al., *Does maternal iodine supplementation during the lactation have a positive impact on neurodevelopment of children? Three-year follow up of a randomized controlled trial*. *Eur J Nutr*, 2021. **60**(7): p. 4083-4091.
43. Ravera, S., et al., *The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Molecular Physiology and Preclinical and Clinical Applications*. *Annu Rev Physiol*, 2017. **79**: p. 261-289.
44. Spitzweg, C., A.E. Heufelder, and J.C. Morris, *Thyroid iodine transport*. *Thyroid*, 2000. **10**(4): p. 321-30.
45. Grasberger, H. and S. Refetoff, *Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(27): p. 18269-72.
46. Corvilain, B., et al., *The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating system modulates protein iodination and the activity of the pentose phosphate pathway in dog thyroid*. *Endocrinology*, 1991. **128**(2): p. 779-85.
47. Di Jeso, B. and P. Arvan, *Thyroglobulin From Molecular and Cellular Biology to Clinical Endocrinology*. *Endocr Rev*, 2016. **37**(1): p. 2-36.
48. Kwak, M.J., *Clinical genetics of defects in thyroid hormone synthesis*. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*, 2018. **23**(4): p. 169-175.
49. Gnidehou, S., et al., *Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site*. *FASEB J*, 2004. **18**(13): p. 1574-6.
50. Grasberger, H. and S. Refetoff, *Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dysmorphogenesis*. *Curr Opin Pediatr*, 2011. **23**(4): p. 421-8.
51. Pirahanchi, Y., F. Toro, and I. Jialal, *Physiology, Thyroid Stimulating Hormone*, in *StatPearls*. 2022: Treasure Island (FL).
52. van Trotsenburg, P., et al., *Congenital Hypothyroidism: A 2020-2021 Consensus Guidelines Update-An ENDO-European Reference Network Initiative Endorsed by the European Society for Pediatric Endocrinology and the European Society for Endocrinology*. *Thyroid*, 2021. **31**(3): p. 387-419.
53. Van Vliet, G., *Treatment of congenital hypothyroidism*. *Lancet*, 2001. **358**(9276): p. 86-7.
54. Dussault, J.H., et al., *Preliminary report on a mass screening program for neonatal hypothyroidism*. *J Pediatr*, 1975. **86**(5): p. 670-4.
55. Oerbeck, B., et al., *Congenital hypothyroidism: influence of disease severity and L-thyroxine treatment on intellectual, motor, and school-associated outcomes in young adults*. *Pediatrics*, 2003. **112**(4): p. 923-30.
56. American Academy of P., et al., *Update of newborn screening and therapy for congenital hypothyroidism*. *Pediatrics*, 2006. **117**(6): p. 2290-303.
57. Brockow, I., et al., *Nationaler Screeningreport Deutschland 2019*. Deutsche Gesellschaft für Neugeborenen-Screening e.V., 2021.
58. Hashemipour, M., et al., *Permanent and transient congenital hypothyroidism in Isfahan-Iran*. *J Med Screen*, 2009. **16**(1): p. 11-6.
59. LaFranchi, S.H., et al., *Neonatal hypothyroidism detected by the Northwest Regional Screening Program*. *Pediatrics*, 1979. **63**(2): p. 180-91.
60. Vulmsa, T., M.H. Gons, and J.J. de Vijlder, *Maternal-fetal transfer of thyroxine in congenital hypothyroidism due to a total organification defect or thyroid agenesis*. *N Engl J Med*, 1989. **321**(1): p. 13-6.

61. Shoham, I., et al., *Fetal heart rate tracing patterns associated with congenital hypothyroidism*. Am J Obstet Gynecol, 2009. **201**(1): p. 48 e1-4.
62. Law, W.Y., et al., *Congenital hypothyroidism in Wales (1982-1993): demographic features, clinical presentation and effects on early neurodevelopment*. Clin Endocrinol (Oxf), 1998. **48**(2): p. 201-7.
63. Kaye, C.I., et al., *Newborn screening fact sheets*. Pediatrics, 2006. **118**(3): p. e934-63.
64. Kumar, J., et al., *Increased prevalence of renal and urinary tract anomalies in children with congenital hypothyroidism*. J Pediatr, 2009. **154**(2): p. 263-6.
65. Olivieri, A., et al., *A population-based study on the frequency of additional congenital malformations in infants with congenital hypothyroidism: data from the Italian Registry for Congenital Hypothyroidism (1991-1998)*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(2): p. 557-62.
66. Dunn, J.T., *Iodine supplementation and the prevention of cretinism*. Ann N Y Acad Sci, 1993. **678**: p. 158-68.
67. Hamdoun, E., et al., *Case Report: The Specter of Untreated Congenital Hypothyroidism in Immigrant Families*. Pediatrics, 2016. **137**(5).
68. Peters, C., A.S.P. van Trotsenburg, and N. Schoenmakers, *DIAGNOSIS OF ENDOCRINE DISEASE: Congenital hypothyroidism: update and perspectives*. Eur J Endocrinol, 2018. **179**(6): p. R297-R317.
69. Castanet, M., et al., *Nineteen years of national screening for congenital hypothyroidism: familial cases with thyroid dysgenesis suggest the involvement of genetic factors*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(5): p. 2009-14.
70. Castanet, M., et al., *Familial forms of thyroid dysgenesis among infants with congenital hypothyroidism*. N Engl J Med, 2000. **343**(6): p. 441-2.
71. Wassner, A.J. and R.S. Brown, *Congenital hypothyroidism: recent advances*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2015. **22**(5): p. 407-12.
72. Delange, F., et al., *Increased risk of primary hypothyroidism in preterm infants*. J Pediatr, 1984. **105**(3): p. 462-9.
73. Connelly, K.J., et al., *Congenital hypothyroidism caused by excess prenatal maternal iodine ingestion*. J Pediatr, 2012. **161**(4): p. 760-2.
74. Iseki, M., et al., *Sequential serum measurements of thyrotropin binding inhibitor immunoglobulin G in transient familial neonatal hypothyroidism*. J Clin Endocrinol Metab, 1983. **57**(2): p. 384-7.
75. Hular, I., et al., *A single copy of the recently identified dual oxidase maturation factor (DUOXA) 1 gene produces only mild transient hypothyroidism in a patient with a novel biallelic DUOXA2 mutation and monoallelic DUOXA1 deletion*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(5): p. E841-5.
76. van Tijn, D.A., et al., *Neonatal detection of congenital hypothyroidism of central origin*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(6): p. 3350-9.
77. Hanna, C.E., et al., *Detection of congenital hypopituitary hypothyroidism: ten-year experience in the Northwest Regional Screening Program*. J Pediatr, 1986. **109**(6): p. 959-64.
78. Seo, M.K., et al., *Intellectual development in preschool children with early treated congenital hypothyroidism*. Ann Pediatr Endocrinol Metab, 2017. **22**(2): p. 102-107.
79. ARBEITSGEMEINSCHAFT PÄDIATRISCHE ENDOKRINOLOGIE. *Diagnostik, Therapie und Verlaufskontrolle der Primären angeborenen Hypothyreose [Internet]*. 2010. Zitiert am: 01.05.2024. URL: [https://dgpp.de/cms/media/download\\_gallery/S2k-Leitlinie\\_Primaere\\_angeborene\\_Hypothyreose.pdf](https://dgpp.de/cms/media/download_gallery/S2k-Leitlinie_Primaere_angeborene_Hypothyreose.pdf).

80. Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin e.V. (GNPI). *Neugeborenen-Screening auf angeborene Stoffwechselstörungen, Endokrinopathien, schwere kombinierte Immundefekte (SCID), Sichelzellkrankheit, 5q-assoziierte spinale Muskelatrophie (SMA) und Mukoviszidose.* [Internet]. 2022. Zitiert am 11.05.2023. URL: [https://register.awmf.org/assets/guidelines/024-012I\\_S2k\\_Neugeborenencreening\\_2022-02\\_01.pdf](https://register.awmf.org/assets/guidelines/024-012I_S2k_Neugeborenencreening_2022-02_01.pdf).
81. Elmlinger, M.W., et al., *Reference intervals from birth to adulthood for serum thyroxine (T4), triiodothyronine (T3), free T3, free T4, thyroxine binding globulin (TBG) and thyrotropin (TSH).* Clin Chem Lab Med, 2001. **39**(10): p. 973-9.
82. Uhrmann, S., et al., *Thyroid function in the preterm infant: a longitudinal assessment.* J Pediatr, 1978. **92**(6): p. 968-73.
83. Fisher, D.A., *Thyroid system immaturities in very low birth weight premature infants.* Semin Perinatol, 2008. **32**(6): p. 387-97.
84. Zung, A., et al., *Risk Factors for the Development of Delayed TSH Elevation in Neonatal Intensive Care Unit Newborns.* J Clin Endocrinol Metab, 2017. **102**(8): p. 3050-3055.
85. Korkmaz, G., et al., *Thyroid function in healthy and unhealthy preterm newborns.* Afr Health Sci, 2018. **18**(2): p. 378-383.
86. LaFranchi, S.H., *Screening preterm infants for congenital hypothyroidism: better the second time around.* J Pediatr, 2014. **164**(6): p. 1259-61.
87. Murphy, N., et al., *The hypothalamic-pituitary-thyroid axis in preterm infants; changes in the first 24 hours of postnatal life.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2824-31.
88. Simpson, J., et al., *Serum thyroid hormones in preterm infants and relationships to indices of severity of intercurrent illness.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(3): p. 1271-9.
89. Fisher, D.A., et al., *The hypothalamic-pituitary-thyroid negative feedback control axis in children with treated congenital hypothyroidism.* J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(8): p. 2722-7.
90. Muir, A., et al., *Thyroid scanning, ultrasound, and serum thyroglobulin in determining the origin of congenital hypothyroidism.* Am J Dis Child, 1988. **142**(2): p. 214-6.
91. Supakul, N., et al., *Ultrasound for primary imaging of congenital hypothyroidism.* AJR Am J Roentgenol, 2012. **199**(3): p. W360-6.
92. Kreisner, E., et al., *Accuracy of ultrasonography to establish the diagnosis and aetiology of permanent primary congenital hypothyroidism.* Clin Endocrinol (Oxf), 2003. **59**(3): p. 361-5.
93. Djemli, A., et al., *Twenty years later: a reevaluation of the contribution of plasma thyroglobulin to the diagnosis of thyroid dysgenesis in infants with congenital hypothyroidism.* Clin Biochem, 2004. **37**(9): p. 818-22.
94. Brown, R.S., et al., *Detection of thyrotropin binding inhibitory activity in neonatal blood spots.* J Clin Endocrinol Metab, 1993. **77**(4): p. 1005-8.
95. Connors, M.H. and D.M. Styne, *Transient neonatal 'athyreosis' resulting from thyrotropin-binding inhibitory immunoglobulins.* Pediatrics, 1986. **78**(2): p. 287-90.
96. Momotani, N., et al., *Effects of propylthiouracil and methimazole on fetal thyroid status in mothers with Graves' hyperthyroidism.* J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(11): p. 3633-6.
97. Wirth, S., *Handlungsempfehlung nach der Leitlinie „Diagnostik, Therapie und Verlaufskontrolle der primären angeborenen Hypothyreose“.* Monatsschrift Kinderheilkunde, 2015. **163**(5): p. 471-472.

98. Jonklaas, J., et al., *Guidelines for the treatment of hypothyroidism: prepared by the american thyroid association task force on thyroid hormone replacement*. Thyroid, 2014. **24**(12): p. 1670-751.
99. Cassio, A., et al., *Treatment for congenital hypothyroidism: thyroxine alone or thyroxine plus triiodothyronine?* Pediatrics, 2003. **111**(5 Pt 1): p. 1055-60.
100. von Heppel, J.H., et al., *The use of L-T4 as liquid solution improves the practicability and individualized dosage in newborns and infants with congenital hypothyroidism*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2004. **17**(7): p. 967-74.
101. Bongers-Schokking, J.J., et al., *Influence of timing and dose of thyroid hormone replacement on development in infants with congenital hypothyroidism*. J Pediatr, 2000. **136**(3): p. 292-7.
102. Ng, S.M., D. Anand, and A.M. Weindling, *High versus low dose of initial thyroid hormone replacement for congenital hypothyroidism*. Cochrane Database Syst Rev, 2009(1): p. CD006972.
103. Vogiatzi, M.G. and J.L. Kirkland, *Frequency and necessity of thyroid function tests in neonates and infants with congenital hypothyroidism*. Pediatrics, 1997. **100**(3): p. E6.
104. Kapelari, K., et al., *Pediatric reference intervals for thyroid hormone levels from birth to adulthood: a retrospective study*. BMC Endocr Disord, 2008. **8**: p. 15.
105. Saba, C., et al., *Early Determinants of Thyroid Function Outcomes in Children with Congenital Hypothyroidism and a Normally Located Thyroid Gland: A Regional Cohort Study*. Thyroid, 2018. **28**(8): p. 959-967.
106. Oron, T., et al., *Permanent vs Transient Congenital Hypothyroidism: Assessment of Predictive Variables*. J Clin Endocrinol Metab, 2018. **103**(12): p. 4428-4436.
107. Leger, J., et al., *European Society for Paediatric Endocrinology consensus guidelines on screening, diagnosis, and management of congenital hypothyroidism*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(2): p. 363-84.
108. Cherella, C.E. and A.J. Wassner, *Congenital hypothyroidism: insights into pathogenesis and treatment*. Int J Pediatr Endocrinol, 2017. **2017**: p. 11.
109. Pohlenz, J., et al., *Congenital hypothyroidism due to mutations in the sodium/iodide symporter. Identification of a nonsense mutation producing a downstream cryptic 3' splice site*. J Clin Invest, 1998. **101**(5): p. 1028-35.
110. Portulano, C., M. Paroder-Belenitsky, and N. Carrasco, *The Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS): mechanism and medical impact*. Endocr Rev, 2014. **35**(1): p. 106-49.
111. Hannoush, Z.C. and R.E. Weiss, *Defects of Thyroid Hormone Synthesis and Action*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2017. **46**(2): p. 375-388.
112. Szinnai, G., et al., *Extending the clinical heterogeneity of iodide transport defect (ITD): a novel mutation R124H of the sodium/iodide symporter gene and review of genotype-phenotype correlations in ITD*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(4): p. 1199-204.
113. Forli, F., et al., *Enlarged vestibular aqueduct and Mondini Malformation: audiological, clinical, radiologic and genetic features*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2021. **278**(7): p. 2305-2312.
114. Ladsous, M., et al., *Analysis of the thyroid phenotype in 42 patients with Pendred syndrome and nonsyndromic enlargement of the vestibular aqueduct*. Thyroid, 2014. **24**(4): p. 639-48.
115. Kuhnen, P., et al., *Identification of PENDING (SLC26A4) mutations in patients with congenital hypothyroidism and "apparent" thyroid dysgenesis*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(1): p. E169-76.
116. Reardon, W. and R.C. Trembath, *Pendred syndrome*. J Med Genet, 1996. **33**(12): p. 1037-40.

117. Rubio, I.G. and G. Medeiros-Neto, *Mutations of the thyroglobulin gene and its relevance to thyroid disorders*. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2009. **16**(5): p. 373-8.
118. Targovnik, H.M., S.A. Esperante, and C.M. Rivolta, *Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to thyroglobulin mutations*. *Mol Cell Endocrinol*, 2010. **322**(1-2): p. 44-55.
119. Ris-Stalpers, C. and H. Bikker, *Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to TPO mutations*. *Mol Cell Endocrinol*, 2010. **322**(1-2): p. 38-43.
120. Avbelj, M., et al., *High prevalence of thyroid peroxidase gene mutations in patients with thyroid dysmorphogenesis*. *Eur J Endocrinol*, 2007. **156**(5): p. 511-9.
121. Bakker, B., et al., *Two decades of screening for congenital hypothyroidism in The Netherlands: TPO gene mutations in total iodide organification defects (an update)*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(10): p. 3708-12.
122. Stoupa, A., et al., *Thyroid Hypoplasia in Congenital Hypothyroidism Associated with Thyroid Peroxidase Mutations*. *Thyroid*, 2018. **28**(7): p. 941-944.
123. Tobias, L., et al., *Long-Term Outcome of Patients with TPO Mutations*. *J Clin Med*, 2021. **10**(17).
124. Donko, A., et al., *Hypothyroidism-associated missense mutation impairs NADPH oxidase activity and intracellular trafficking of Duox2*. *Free Radic Biol Med*, 2014. **73**: p. 190-200.
125. Grasberger, H., et al., *Missense mutations of dual oxidase 2 (DUOX2) implicated in congenital hypothyroidism have impaired trafficking in cells reconstituted with DUOX2 maturation factor*. *Mol Endocrinol*, 2007. **21**(6): p. 1408-21.
126. Moreno, J.C., et al., *Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(2): p. 95-102.
127. Maruo, Y., et al., *Transient congenital hypothyroidism caused by biallelic mutations of the dual oxidase 2 gene in Japanese patients detected by a neonatal screening program*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. **93**(11): p. 4261-7.
128. Muzza, M., et al., *The clinical and molecular characterization of patients with dysmorphogenic congenital hypothyroidism reveals specific diagnostic clues for DUOX2 defects*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014. **99**(3): p. E544-53.
129. Vigone, M.C., et al., *Persistent mild hypothyroidism associated with novel sequence variants of the DUOX2 gene in two siblings*. *Hum Mutat*, 2005. **26**(4): p. 395.
130. Liu, S., et al., *A novel missense mutation (I26M) in DUOX2 causing congenital goiter hypothyroidism impairs NADPH oxidase activity but not protein expression*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015. **100**(4): p. 1225-9.
131. Zamproni, I., et al., *Biallelic inactivation of the dual oxidase maturation factor 2 (DUOX2) gene as a novel cause of congenital hypothyroidism*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. **93**(2): p. 605-10.
132. Sun, X., et al., *Expression of Iodotyrosine Deiodinase in Thyroid and Other Organs in Iodine-Deficient and Iodine-Excess Rats*. *Biol Trace Elem Res*, 2015. **167**(2): p. 272-9.
133. Moreno, J.C., et al., *Mutations in the iodotyrosine deiodinase gene and hypothyroidism*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(17): p. 1811-8.
134. de Filippis, T., et al., *A frequent oligogenic involvement in congenital hypothyroidism*. *Hum Mol Genet*, 2017. **26**(13): p. 2507-2514.
135. Lof, C., et al., *Detection of Novel Gene Variants Associated with Congenital Hypothyroidism in a Finnish Patient Cohort*. *Thyroid*, 2016. **26**(9): p. 1215-24.

136. Sharma, A.K., A.C. Rigby, and S.L. Alper, *STAS domain structure and function*. Cell Physiol Biochem, 2011. **28**(3): p. 407-22.
137. Dorwart, M.R., et al., *Congenital chloride-losing diarrhea causing mutations in the STAS domain result in misfolding and mistrafficking of SLC26A3*. J Biol Chem, 2008. **283**(13): p. 8711-22.
138. Chernova, M.N., et al., *Acute regulation of the SLC26A3 congenital chloride diarrhoea anion exchanger (DRA) expressed in Xenopus oocytes*. J Physiol, 2003. **549**(Pt 1): p. 3-19.
139. Lohi, H., et al., *Isoforms of SLC26A6 mediate anion transport and have functional PDZ interaction domains*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(3): p. C769-79.
140. Detro-Dassen, S., et al., *Conserved dimeric subunit stoichiometry of SLC26 multifunctional anion exchangers*. J Biol Chem, 2008. **283**(7): p. 4177-88.
141. Hallworth, R. and M.G. Nichols, *Prestin in HEK cells is an obligate tetramer*. J Neurophysiol, 2012. **107**(1): p. 5-11.
142. Ohana, E., et al., *Diverse transport modes by the solute carrier 26 family of anion transporters*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 10): p. 2179-85.
143. Karniski, L.P., *Mutations in the diastrophic dysplasia sulfate transporter (DTDST) gene: correlation between sulfate transport activity and chondrodysplasia phenotype*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(14): p. 1485-90.
144. Kim, K.H., et al., *SLC26A7 is a Cl<sup>-</sup> channel regulated by intracellular pH*. J Biol Chem, 2005. **280**(8): p. 6463-70.
145. Chang, M.H., et al., *Slc26a9--anion exchanger, channel and Na<sup>+</sup> transporter*. J Membr Biol, 2009. **228**(3): p. 125-40.
146. Rahmati, N., et al., *Slc26a11 is prominently expressed in the brain and functions as a chloride channel: expression in Purkinje cells and stimulation of V H(+)-ATPase*. Pflugers Arch, 2013. **465**(11): p. 1583-97.
147. Ohana, E., et al., *Determinants of coupled transport and uncoupled current by the electrogenic SLC26 transporters*. J Gen Physiol, 2011. **137**(2): p. 239-51.
148. Ko, S.B., et al., *A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in cystic fibrosis*. EMBO J, 2002. **21**(21): p. 5662-72.
149. Dawson, P.A. and D. Markovich, *Pathogenetics of the human SLC26 transporters*. Curr Med Chem, 2005. **12**(4): p. 385-96.
150. Kere, J., *Overview of the SLC26 family and associated diseases*. Novartis Found Symp, 2006. **273**: p. 2-11; discussion 11-8, 261-4.
151. Markovich, D., *Physiological roles of renal anion transporters NaS1 and Sat1*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **300**(6): p. F1267-70.
152. Jiang, Z., et al., *Calcium oxalate urolithiasis in mice lacking anion transporter Slc26a6*. Nat Genet, 2006. **38**(4): p. 474-8.
153. Liberman, M.C., et al., *Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier*. Nature, 2002. **419**(6904): p. 300-4.
154. Demitrack, E.S., M. Soleimani, and M.H. Montrose, *Damage to the gastric epithelium activates cellular bicarbonate secretion via SLC26A9 Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. **299**(1): p. G255-64.
155. Toure, A., et al., *The testis anion transporter 1 (Slc26a8) is required for sperm terminal differentiation and male fertility in the mouse*. Hum Mol Genet, 2007. **16**(15): p. 1783-93.
156. Soleimani, M., *SLC26 Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchangers in the kidney: roles in health and disease*. Kidney Int, 2013. **84**(4): p. 657-66.
157. Targovnik, H.M., K.G. Scheps, and C.M. Rivolta, *Defects in protein folding in congenital hypothyroidism*. Mol Cell Endocrinol, 2020. **501**: p. 110638.

158. Lohi, H., et al., *Functional characterization of three novel tissue-specific anion exchangers SLC26A7, -A8, and -A9*. J Biol Chem, 2002. **277**(16): p. 14246-54.
159. [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000147606;r=8:91209494-91398155](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000147606;r=8:91209494-91398155) [Internet]. Zitiert am: 25.05.2024.
160. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/115111> [Internet]. Zitiert am: 25.05.2024.
161. Kujala, M., et al., *Expression of ion transport-associated proteins in human efferent and epididymal ducts*. Reproduction, 2007. **133**(4): p. 775-84.
162. Petrovic, S., et al., *Identification of a basolateral Cl-/HCO<sub>3</sub>- exchanger specific to gastric parietal cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **284**(6): p. G1093-103.
163. Vincourt, J.B., et al., *Molecular cloning of SLC26A7, a novel member of the SLC26 sulfate/anion transporter family, from high endothelial venules and kidney*. Genomics, 2002. **79**(2): p. 249-56.
164. Kim, K.X., et al., *Slc26a7 chloride channel activity and localization in mouse Reissner's membrane epithelium*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97191.
165. Cao, X., M. Soleimani, and B.A. Hughes, *SLC26A7 constitutes the thiocyanate-selective anion conductance of the basolateral membrane of the retinal pigment epithelium*. Am J Physiol Cell Physiol, 2020. **319**(4): p. C641-C656.
166. Yin, K., et al., *SLC26A Gene Family Participate in pH Regulation during Enamel Maturation*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0144703.
167. Petrovic, S., et al., *SLC26A7: a basolateral Cl-/HCO<sub>3</sub>- exchanger specific to intercalated cells of the outer medullary collecting duct*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(1): p. F161-9.
168. Tanimura, Y., et al., *Regulation of solute carrier family 26 member 7 (Slc26a7) by thyroid stimulating hormone in thyrocytes*. Endocr J, 2021. **68**(6): p. 691-699.
169. Kosiek, O., et al., *SLC26A7 can function as a chloride-loading mechanism in parietal cells*. Pflugers Arch, 2007. **454**(6): p. 989-98.
170. Dudas, P.L., et al., *Immunolocalization of anion transporter Slc26a7 in mouse kidney*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **290**(4): p. F937-45.
171. Barone, S., et al., *Differential regulation of basolateral Cl-/HCO<sub>3</sub>- exchangers SLC26A7 and AE1 in kidney outer medullary collecting duct*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(8): p. 2002-11.
172. Xu, J., et al., *Chloride/bicarbonate exchanger SLC26A7 is localized in endosomes in medullary collecting duct cells and is targeted to the basolateral membrane in hypertonicity and potassium depletion*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(4): p. 956-67.
173. Ullah, A., et al., *SLC26A7 protein is a chloride/bicarbonate exchanger and its abundance is osmolarity- and pH-dependent in renal epithelial cells*. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2020. **1862**(6): p. 183238.
174. Sun, X. and S. Petrovic, *Increased acid load and deletion of AE1 increase Slc26a7 expression*. Nephron Physiol, 2008. **109**(3): p. p29-35.
175. Acar, S., et al., *Screening of 23 candidate genes by next-generation sequencing of patients with permanent congenital hypothyroidism: novel variants in TG, TSHR, DUOX2, FOXE1, and SLC26A7*. J Endocrinol Invest, 2021.
176. Kujala, M., et al., *SLC26A6 and SLC26A7 anion exchangers have a distinct distribution in human kidney*. Nephron Exp Nephrol, 2005. **101**(2): p. e50-8.
177. Bruellman, R.J., et al., *Increased Prevalence of TG and TPO Mutations in Sudanese Children With Congenital Hypothyroidism*. J Clin Endocrinol Metab, 2020. **105**(5).
178. Bizhanova, A., et al., *Analysis of cellular localization and function of carboxy-terminal mutants of pendrin*. Cell Physiol Biochem, 2011. **28**(3): p. 423-34.

179. Riedel, C., O. Levy, and N. Carrasco, *Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21458-63.
180. Pesce, L., et al., *TSH regulates pendrin membrane abundance and enhances iodide efflux in thyroid cells*. Endocrinology, 2012. **153**(1): p. 512-21.
181. Brommage, R., et al., *High-throughput screening of mouse gene knockouts identifies established and novel skeletal phenotypes*. Bone Res, 2014. **2**: p. 14034.
182. Park, K.S., *Analysis of Worldwide Carrier Frequency and Predicted Genetic Prevalence of Autosomal Recessive Congenital Hypothyroidism Based on a General Population Database*. Genes (Basel), 2021. **12**(6).
183. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/> [Internet]. Zitiert am: 25.05.2024.
184. <https://gnomad.broadinstitute.org> [Internet]. Zitiert am: 25.05.2024.
185. <https://evs.gs.washington.edu/EVS/> [Internet]. Zitiert am: 25.05.2024.
186. <https://www.mutationtaster.org> [Internet]. Zitiert am: 25.05.2024.
187. <https://refubium.fu-berlin.de/handle/fub188/4800> [Internet]. Zitiert am: 25.05.2024.
188. <http://exon.cshl.edu/ESE/> [Internet]. Zitiert am: 25.05.2024.
189. <http://www.introni.it/splicing.html> [Internet]. Zitiert am: 25.05.2024.
190. Smith, P.J., et al., *An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(16): p. 2490-508.
191. Piva, F., et al., *SpliceAid: a database of experimental RNA target motifs bound by splicing proteins in humans*. Bioinformatics, 2009. **25**(9): p. 1211-3.
192. Cartegni, L., et al., *ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3568-71.
193. <https://swissmodel.expasy.org> [Internet]. Zitiert am: 25.05.2024.
194. Bienert, S., et al., *The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(D1): p. D313-D319.
195. <https://string-db.org> [Internet]. Zitiert am: 25.05.2024.
196. Szklarczyk, D., et al., *The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets*. Nucleic Acids Res, 2021. **49**(D1): p. D605-D612.
197. Evans, C., S. Tennant, and P. Perros, *Thyroglobulin in differentiated thyroid cancer*. Clin Chim Acta, 2015. **444**: p. 310-7.
198. Schadt, E.E., S. Turner, and A. Kasarskis, *A window into third-generation sequencing*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(R2): p. R227-40.
199. Haferlach, T., *Möglichkeiten und Grenzen von Next Generation Sequencing (NGS) in der hämatologischen Diagnostik*. 2016. [Internet] Zitiert am: 25.05.2024. URL: <https://www.trillium.de/zeitschriften/trillium-krebsmedizin/archiv/ausgaben-2016/heft-32016/moeglichkeiten-und-grenzen-von-next-generation-sequencing-ngs-in-der-haematologischen-diagnostik.html>. 2016.
200. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs4734009#frequency\\_tab](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs4734009#frequency_tab) [Internet]. Zitiert am: 25.05.2024.
201. <https://phobius.sbc.su.se> [Internet]. Zitiert am: 25.05.2024.
202. Pohlenz, J. and S. Refetoff, *Mutations in the sodium/iodide symporter (NIS) gene as a cause for iodide transport defects and congenital hypothyroidism*. Biochimie, 1999. **81**(5): p. 469-76.
203. Ponthier, J.L., et al., *Fox-2 splicing factor binds to a conserved intron motif to promote inclusion of protein 4.1R alternative exon 16*. J Biol Chem, 2006. **281**(18): p. 12468-74.

204. Zhang, Q., et al., *Nuclear speckle specific hnRNP D-like prevents age- and AD-related cognitive decline by modulating RNA splicing*. Mol Neurodegener, 2021. **16**(1): p. 66.
205. Vieira, N.M., et al., *A defect in the RNA-processing protein HNRPD1 causes limb-girdle muscular dystrophy 1G (LGMD1G)*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(15): p. 4103-10.
206. Anna, A. and G. Monika, *Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation*. J Appl Genet, 2018. **59**(3): p. 253-268.
207. Frumkin, I., et al., *Evolution of intron splicing towards optimized gene expression is based on various Cis- and Trans-molecular mechanisms*. PLoS Biol, 2019. **17**(8): p. e3000423.
208. Shaul, O., *How introns enhance gene expression*. Int J Biochem Cell Biol, 2017. **91**(Pt B): p. 145-155.
209. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> [Internet]. Zitiert am: 25.05.2024.
210. Narla, G., et al., *A germline DNA polymorphism enhances alternative splicing of the KLF6 tumor suppressor gene and is associated with increased prostate cancer risk*. Cancer Res, 2005. **65**(4): p. 1213-22.
211. Hermanns, P., C. Classen, and J. Pohlenz, *A Novel Homozygous Mutation in the Solute Carrier Family 26 Member 7 Gene Causes Thyroid Dysmorphogenesis in a Girl with Congenital Hypothyroidism*. Thyroid, 2020. **30**(12): p. 1831-1833.

## Anhang

Name	Hauptvorkommen	Funktion	Assoziierte Erkrankungen  <b>Mensch/ Knockout-mäuse</b>	Besonderheiten und wichtige Funktionen
<i>SLC26A1</i> ( <i>Sat-1</i> )	Leber, Darm, Niere	<u>Austauscher:</u> Oxalate, Glyoxalat, Cl <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	<i>Urolithiasis,</i> <i>Hyposulfatämie,</i> <i>Hypersulfaturie,</i> <i>Hyperoxalurie,</i> <i>Nephrokalzinose,</i>	<u>SO<sub>4</sub><sup>-</sup>-Transport:</u> Aktivierung durch extrazellulären Cl <sup>-</sup> -Konzentration, Halogenide, Formiat und Laktat  <u>SO<sub>4</sub><sup>-</sup>-Transport in der Niere:</u> Aktivierung von <i>SLC26A1</i> durch sauren pH-Wert
<i>SLC26A2</i> ( <i>DTDST</i> )	Chondrozyten, Plazenta, Niere, Darm, Schweißdrüse, Lunge	<u>Austauscher:</u> SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , Oxalat, Cl <sup>-</sup> , OH <sup>-</sup>	<b>Chondrodysplasien</b>	<u>Chondrodysplasien:</u> Unfähigkeit extrazelluläres Cystein als Quelle von SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> für Sulfatierung zu nutzen, was zu Störungen im Aufbau der extrazellulären Matrix führt  <u>Darm:</u> Rolle von <i>SLC26A2</i> in Kolonkarzinom vermutet;  <i>SLC26A2</i> -Hochregulation in Morbus Chron
<i>SLC26A3</i> ( <i>DRA,CLD</i> )	Spermien, Darm	<u>Austauscher:</u> Cl <sup>-</sup> , OH <sup>-</sup> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , Oxalat, SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	<b>Congenitale Chloriddiarrhoe</b>	<u>CFTR:</u> Gegenseitige Aktivierung durch direkte Interaktion der STAS-Domäne von <i>SLC26A3</i> mit der R-Domäne von CFTR  <u>Darm:</u> In der intestinalen Mucosa teilweise an Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Austauscher NHE3 gekoppelt für die elektroneutrale NaCl-Reabsorption  Verminderte mRNA-Expression in Colitis ulcerosa Patienten und bei

				<p>EPEC, C.rodentium colitis - Infektionen</p> <p><u>Pankreas:</u></p> <p>Gemeinsam mit CFTR für die HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Sekretion und Cl<sup>-</sup>-Rückresorption verantwortlich</p> <p><u>Spermien:</u></p> <p>Rolle bei der Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Homöostase während der epididymalen Reifung und Kapazitation</p> <p><u>Tumorsuppresor-Gen:</u></p> <p>herunterreguliert in Adenomen</p>
<p><i>SLC26A4</i> (<i>Pendrin/PDS</i>)</p>	<p>Innenohr, Schilddrüse, Niere, Speicheldrüsengang, Atemwege, Brustdrüse, Endometrium, Plazenta</p>	<p><u>Austauscher:</u></p> <p>Cl<sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, Formate, Nitrate, SCN<sup>-</sup></p> <p>(Selektivität für monovalente Ionen)</p>	<p><b>DFNB4 (isolierte sensorineurale Schwerhörigkeit), Pendred-Syndrom</b></p>	<p><u>Innenohr:</u></p> <p>Mutationen in <i>SLC26A4</i> führen zu einem veränderten Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austausch, wodurch sich die Zusammensetzung der Endolymphe ändert und es zu Megaotolithen und Malformationen der Otolithen kommt</p> <p><u>Schilddrüse:</u></p> <p>Keine Schilddrüsenmanifestation bei Knockout-Mäusen</p> <p>Transkription wird durch TG, TSH und Iod beeinflusst</p> <p><u>Niere:</u></p> <p>In Typ B-Zellen zusammen mit <i>SLC4A8</i> für die Cl<sup>-</sup>-Reabsorption verantwortlich</p> <p><u>Atemwege:</u></p> <p>Durch Il-4 vermittelten Cl<sup>-</sup>/SCN<sup>-</sup>-Austausch kommt es zur Bildung eines antimicrobiellen Milieus durch die Lactoperoxidase</p> <p><i>SLC26A4</i>- Hochregulation in Asthma und COPD-Modellen beobachtet</p>

<p><i>SLC26A5</i> (<i>Prestin</i>)</p>	<p>Innenohr, Gehirn, Herz, Milz, Hoden</p>	<p>Motorprotein der äußeren Haarzellen</p>	<p><i>nicht syndromale Schwerhörigkeit</i></p>	<p><u>Veränderte Transporteigenschaft mit Unterschieden in den konservierten hydrophoben Regionen:</u>  SLC26A5 fungiert als Motorprotein, bei dem Cl<sup>-</sup> und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> als Spannungssensoren funktionieren  <u>Innenohr:</u>  Motorprotein der äußeren Haarzellen, das an der oszillierenden Längenänderung und somit an der Verstärkung des Innenohrsignal beteiligt ist;  Im Menschen kommt es nicht zur Taubheit  <u>Angeborene Hypothyreose:</u>  Bei Ratten wurde ein TRE (Thyroid Response Element) gefunden, wodurch T3 Einfluss auf <i>Slc26a5</i>-Expression hat.</p>
<p><i>SLC26A6</i> (<i>Pat-1</i>, <i>CFEX</i>)</p>	<p>Niere, Darm, Pankreas, Herz, Muskel, Magen, Ösophagus, Plazenta</p>	<p><u>Austauscher:</u> Cl<sup>-</sup>, Format, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, OH<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Oxalat, Nitrat</p>	<p><i>Urolithiasis, Hyperoxalämie, Hyperoxalurie</i></p>	<p><u>Pankreas:</u>  Gemeinsam mit CFTR für die HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Sekretion und Cl<sup>-</sup>-Rückresorption verantwortlich  <u>Niere:</u>  Rolle beim Cl<sup>-</sup>/Formiat Austausch im proximalen Tubulus  <u>Darm:</u>  In den Belegzellen des Magens wird <i>SLC26A6</i> mit H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase koexprimiert;  Im Duodenum wird <i>SLC26A6</i> mit <i>SLC26A3</i> koexprimiert</p>
<p><i>SLC26A8</i> (<i>Tat-1</i>)</p>	<p>Spermatozyten, Spermien, Gehirn</p>	<p><u>Austauscher:</u> Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Oxalat</p>	<p><i>Unfruchtbarkeit beim männlichen Geschlecht</i></p>	<p><u>Spermien:</u>  Unfruchtbarkeit auf Grund von unbeweglichen Spermien mit reduziertem ATP-Gehalt;  Beim unfruchtbaren Männern bisher nur bei einem Mann mit</p>

				Asthenozoospermie SLC26A8- Veränderung festgestellt
SLC26A9	Gehirn, Lunge, Magen	<u>Austauscher:</u> Cl <sup>-</sup> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>  <u>Kanal:</u> Cl <sup>-</sup>  (hohe Selektivität),  HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>  (geringe Selektivität)	Hypochlorhydrie	Hemmung des Cl <sup>-</sup> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Austausches durch NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> und sauren pH
SLC26A10	-	Pseudogen	-	Bisher beim Menschen kein vollständiges Protein mit intakter STAS-Domäne nachgewiesen
SLC26A11 (KBAT)	Ubiquitär	<u>Austauscher:</u> SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Oxalat, HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>  <u>Kanal:</u> Cl <sup>-</sup>	-	<u>Niere:</u>  In der apikalen Membran von Typ A interkalierten Zellen: Kokalisation mit vH <sup>+</sup> -ATPase

Tabelle 14: Übersicht der SLC26-Gene mit Ausnahme von SLC26A7, Tabelle nach [12, 14]

## Danksagung

Ich möchte mich an erster Stelle ganz herzlich bei meiner Betreuerin [REDACTED] [REDACTED] und meinem Doktorvater [REDACTED] bedanken. Sie haben mich, dank Ihrer exzellenten Betreuung, das selbstständige wissenschaftliche Arbeiten und die experimentelle Laborarbeit schätzen und lieben gelernt. Vielen Dank für Ihre uneingeschränkte Unterstützung, für zahlreiche Anregungen und viele sehr schöne Stunden im Labor.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe [REDACTED], Molekulare Pädiatrische Endokrinologie, insbesondere bei [REDACTED], für die Unterstützung beim experimentellen Teil der Arbeit und die familiäre Arbeitsatmosphäre im Labor bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinen Eltern [REDACTED] sowie meinen Geschwistern [REDACTED], die mir während meiner gesamten Studienzeit und Doktorarbeit mit Rat und Tat beiseite standen.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Ehemann [REDACTED] bedanken. Er hat mich stets motiviert und mich immer in jeglicher Art unterstützt.

## Lebenslauf

