

Aus dem Institut für Experimentelle Endokrinologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

**DISSERTATION**

**NIS- und Pendrin-Autoantikörper als diagnostische Marker von  
Schilddrüsenerkrankungen**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anna-Maria Eleftheriadou

aus Lübeck

Datum der Promotion: 04.03.2022

## **Meinen Eltern in Dankbarkeit**

**" ἐὰν μὴ ἔλπηται ἀνέλπιστον οὐκ ἐξευρήσει,  
ἀνεξερεύνητον ἔδν καὶ ἄπορον."**

Αποσπάσματα, B 18

Ἡράκλειτος (540-480 π.Χ.)

Ἑλληνας φιλόσοφος

**"Wer nicht hofft, wird Unerhofftes nicht finden; denn es  
ist unaufspürbar und unzugänglich."**

Fragmentum, B 18

Heraklit (540-480 v.Chr.)

Griechischer Philosoph

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>8</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>10</b>
1.1. Iod und Schilddrüsenhormonbiosynthese .....	10
1.2. Natrium-Iodid-Symporter und Pendrin.....	11
1.3. Autoimmunerkrankungen .....	12
1.4. Chronische Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse .....	12
1.5. NIS- und PDS-Autoantikörper bei schilddrüsenerkrankten Patienten .....	14
1.6. Zielsetzung der Arbeit.....	14
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1. Material .....	15
2.2. Humane Proben.....	15
2.3. Expression von NIS-Luc und PDS-Luc in HEK293-Zellen .....	16
2.4. Testen der Serumproben auf NIS- und PDS-aAk durch Immunpräzipitation .....	17
2.5. Statistische Auswertung .....	17
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>19</b>
3.1. Expression von NIS-Luc und PDS-Luc in HEK293-Zellen.....	19
3.2. Analyse der Serumproben von Kontrollen und Schilddrüsenpatienten auf aAk gegen NIS und PDS.....	20
3.3. Analyse der aAk-Eigenschaften in Serumproben zur Validierung des NIS- und PDS-aAk-Assays .....	21
3.4. Stabilität des NIS- und PDS-aAk Signals im Serum nach mehrfachen Zyklen des Einfrierens und Auftauens.....	23
3.5. Verteilung von NIS-aAk und PDS-aAk bei Schilddrüsenenerkrankungen .....	25
3.6. NIS-aAk und PDS-aAk im Zusammenhang mit Mikronährstoffen und anderen Autoantikörpern.....	27
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>29</b>
<b>5. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>34</b>
<b>6. Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>38</b>
<b>7. Publikation</b> .....	<b>39</b>
<b>8. Lebenslauf</b> .....	<b>50</b>
<b>9. Danksagung</b> .....	<b>52</b>

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Schematische Darstellung der Schilddrüsenhormonbiosynthese.....	11
<b>Abbildung 2:</b>	Charakterisierung von neuartigen Assays für NIS- und PDS-spezifische Autoantikörper.....	19
<b>Abbildung 3:</b>	Prävalenz von NIS- und PDS-aAk bei gesunden Probanden (Kontrolle) und Schilddrüsenpatienten.....	21
<b>Abbildung 4:</b>	Charakterisierung der Signallinearität von NIS- und PDS-aAk in positiven Serumproben.....	22
<b>Abbildung 5:</b>	Charakterisierung von NIS- und PDS-aAk in Serumproben über Kombinations-Serumanalytik.....	23
<b>Abbildung 6:</b>	Test auf Signalstabilität bei wiederholten Zyklen des Einfrierens und Auftauens von Serumproben.....	24
<b>Abbildung 7:</b>	Prävalenz von NIS-aAk (A) und PDS-aAk (B) bei Schilddrüsen-erkrankten.....	26
<b>Abbildung 8:</b>	Verhältnis von NIS-aAk und PDS-aAk zum Selen- und Zinkstatus.....	27
<b>Abbildung 9:</b>	Verhältnis von NIS-aAk und PDS-aAk zu den TSHR-aAk und TPO-aAk.....	28
<b>Tabelle 1:</b>	Studiendesign. Klinische Parameter der Schilddrüsen-erkrankten und gesunden Kontrollen.....	16
<b>Tabelle 2:</b>	Übersicht über berichtete Prävalenzen von NIS-aAk und PDS-aAk in analytischen Studien.....	31

## Abkürzungsverzeichnis

aAb	Autoantibody
aAk	Autoantikörper
ANOVA	Analysis of Variance
BI	Binding Indices/ Bindungsindizes
CV	Coefficient of Variation/ Variationskoeffizient
DIT	Diiodtyrosin/ Diiodiertes Tyrosin
EBSS	Earle's balanced salt solutions
FBS	Fetal Bovine Serum
HEK293	Human embryonic kidney cells, line 293
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hNIS	humaner Natrium-Iodid-Symporter
HT	Hashimoto Thyreoiditis
Hypo	Hypothyreose
ICD-10	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision
IQR	Interquartile range/ Interquartilsabstand
Luc	Firefly-Luciferase
MB/ M. Basedow	Morbus Basedow
MIT	Monoiodtyrosin/ Monoiodiertes Tyrosin
MW	Arithmetischer Mittelwert

NaClO <sub>4</sub>	Natriumperchlorat
NIS	Natrium-Iodid-Symporter
P75	75. Perzentile
PDS	Pendrin
RLU	Relative Light Units/ relative Lichteinheiten
SCa	Schilddrüsenkarzinom
SD	Standard Deviation/ Standardabweichung
Se	Selen
STRN	Struma nodosa
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin
TdQ	Thyreoiditis de Quervain
Tg	Thyreoglobulin
TPO	Thyreoperoxidase
TSH	Thyreoid-stimulierendes Hormon
TSHR	TSH-Rezeptor
TSHR-aAk	TSH-Rezeptor-Autoantikörper
Zn	Zink

## Zusammenfassung

**Einleitung:** Iod ist ein essentieller Bestandteil in der Schilddrüsenhormon-Biosynthese. Der Iodid-Transport durch die Thyreozyten erfolgt hauptsächlich durch den basolateralen Natrium-Iodid-Symporter (NIS, SLC5A5) und den apikalen Anionen-Austauscher Pendrin (PDS, SLC26A4). Die Rolle von TPO- und TSH-Rezeptor-Autoantikörpern in der Pathogenese und Diagnostik von autoimmunbedingten Schilddrüsenerkrankungen ist gut etabliert. Widersprüchlich zeigen sich allerdings Berichte über die Prävalenz und den diagnostischen Nutzen von Autoantikörpern (aAk) gegen NIS und PDS; dies ist möglicherweise auf die kleinen Studiengruppen und methodische Unterschiede der publizierten Arbeiten zurückzuführen.

**Methoden:** Es erfolgte die Etablierung zweier neuartiger nicht-radioaktiver Assays mit den Antigenen NIS und PDS in voller Länge. Dafür wurden NIS und PDS rekombinant als Fusionsprotein mit Firefly-Luciferase in stabil transfizierten HEK293-Zellen exprimiert. Hiermit wurden Serumproben einer großen Kohorte von 323 Schilddrüsenpatienten und 400 gesunden Kontrollen vermessen.

**Ergebnisse:** Schilddrüsenpatienten zeigten eine ca. viermal höhere Prävalenz für NIS-aAk (7,7 %) als Kontrollen (1,8 %), während die Prävalenz von PDS-aAk bei Schilddrüsenpatienten und Kontrollen ähnlich war (7,7 % vs. 5,0 %). Die höchste Prävalenz von NIS- und PDS-aAk zeigte sich in der Subgruppe der M. Basedow Patienten (12,3 % und 11,0 %). Es zeigte sich keine Beziehung der untersuchten aAk zu den TPO-aAk oder TSH-Rezeptor-aAk-Titern bzw. dem Selen- oder Zinkstatus. Die Reproduzierbarkeit der Assaysignale wurde hinsichtlich Linearität, Stabilität und Abwesenheit von Matrixeffekten verifiziert.

**Schlussfolgerungen:** Die Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit aktuellen Studien. Während der Bestimmung von PDS-aAk bei Schilddrüsenpatienten derzeit kein diagnostischer Wert zukommt, zeigte sich eine mögliche Relevanz von NIS-aAk für eine verbesserte Diagnostik von Schilddrüsenerkrankungen.



## Abstract

**Introduction:** Iodine is an essential component in thyroid hormone biosynthesis. Iodide transport through thyrocytes is mainly mediated by the basolateral sodium-iodide-symporter (NIS, SLC5A5) and the apical anion exchanger pendrin (PDS, SLC26A4). The role of TPO- and TSH-receptor-autoantibodies in the pathogenesis and diagnosis of autoimmune thyroid disease is well established. However, reports regarding the prevalence and diagnostic utility of autoantibodies (aAb) against NIS and PDS have been contradictory, possibly due to small study groups and underlying methodological differences of the published papers.

**Methods:** We established two novel non-radioactive assays using the full-length antigens NIS and PDS. For this purpose, NIS and PDS were recombinantly expressed as fusion protein with firefly-luciferase in stably transfected HEK293 cells. Serum samples from a large cohort of 323 thyroid patients and 400 healthy controls were screened for NIS- and PDS-aAb.

**Results:** Thyroid patients showed an approximately fourfold higher prevalence of NIS-aAb (7.7%) than controls (1.8%), while the prevalence of PDS-aAb was similar in thyroid patients and controls (7.7% vs. 5.0%). The highest prevalence of NIS- and PDS-aAb was seen in the subgroup of Graves' disease patients (12.3% and 11.0%, respectively). No correlation was found between the investigated aAb-titers and TPO-aAb or TSH-receptor-aAb or selenium or zinc status. The reproducibility of assay signals was verified with respect to linearity, stability and absence of matrix effects.

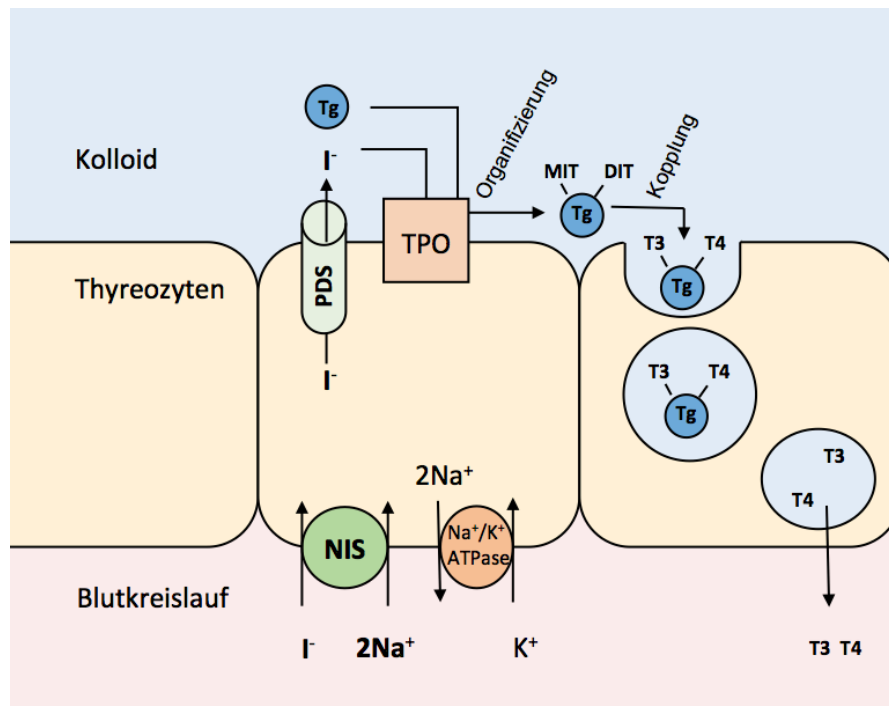
**Conclusions:** The results are in agreement with recent studies. While a determination of PDS-aAb in thyroid patients does not yet seem to be of diagnostic value, a possible relevance of NIS-aAb for an improved diagnosis of thyroid disease was shown.

# 1. Einleitung

## 1.1. Iod und Schilddrüsenhormonbiosynthese

Iod ist ein essentieller Mikronährstoff und kann daher nur über die Nahrung oder Iod Supplemente aufgenommen werden (1, 2). Es spielt eine zentrale Rolle bei der Biosynthese der Schilddrüsenhormone Triiodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) (1-5). Die Verfügbarkeit von Schilddrüsenhormonen basiert auf der Aufnahme des Iodid durch die Thyreozyten und ist entscheidend für den Stoffwechsel sowie für die Entwicklung, Reifung und Erhaltung des Nervensystems, der Skelettmuskulatur und der Lunge (1-6). Ein unbehandelter Iodmangel und ein daraus resultierender Mangel an Schilddrüsenhormonen während der Schwangerschaft und der frühen Kindheit kann zu irreversiblen kognitiven und körperlichen Beeinträchtigungen führen, was als kongenitale Hypothyreose bezeichnet wird und zum Vollbild des Kretinismus führen kann (1, 2, 7).

Um eine ausreichende T3- und T4-Synthese zu gewährleisten, ist der Transport von Iodid aus dem Blutkreislauf durch die Thyreozyten in das Schilddrüsenkolloid essentiell (3, 4, 8). Dabei steuert der Natrium-Iodid-Symporter (NIS), der an der basolateralen Membran des Thyreozyten lokalisiert ist, die Iodidaufnahme aus dem Blutstrom (Abbildung 1). Der Prozess wird durch einen elektrochemischen Natriumgradienten gesteuert, der durch eine ebenfalls an der basolateralen Membran lokalisierte  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase erzeugt wird. Nach der Iodidaufnahme aus dem Blutkreislauf in die Schilddrüse erfolgt die Translokation von Iodid aus der apikalen Membran in das Kolloid teilweise oder überwiegend über den Chlorid/Iodid-, Iodid/Bikarbonat- und Chlorid/Bikarbonat-Austauscher Pendrin (PDS) (2-4). Im Follikellumen oxidiert die Thyreoperoxidase (TPO) Iodid und baut es kovalent in Tyrosyl-Resten des Proteins Thyreoglobulin (Tg) ein, ein Vorgang, der als Organifizierung bezeichnet wird. Dabei kommt es zur Bildung von Monoiodtyrosin (MIT) und Diiodtyrosin (DIT). Die anschließende Kopplung der iodierten Tyrosyl-Resten (MIT/DIT) führt zur Bildung der Schilddrüsenhormone T3 und T4. Die Schilddrüsenhormone werden entweder im Follikellumen der Schilddrüse gespeichert oder nach erfolgter Endozytose und Proteolyse in den Blutkreislauf abgegeben (6, 9).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Schilddrüsenhormonbiosynthese. Der Symporter NIS, welcher auf der basolateralen Membran der Thyreozyten lokalisiert ist, transportiert unter Ausnutzung des Natriumgradienten, der durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase erzeugt wird, Iodid zusammen mit Natrium in die Zelle. Der Iodid-Ausstrom in das Kolloid wird durch PDS vermittelt, das an der apikalen Membran der Thyreozyten lokalisiert ist. Nach der Oxidation durch TPO wird Iodid mit Hilfe von TPO in Tyrosyl-Resten des Tg-Moleküls eingebaut und bildet MIT und DIT. Dieser Vorgang wird als Organifizierung bezeichnet. Die anschließende Kopplung von MIT/DIT führt zur Bildung von T3/T4 am Protein Tg. Nach Endozytose und Proteolyse lösen sich T3 und T4 vom Tg ab, und die Schilddrüsenhormone können in den Blutkreislauf abgegeben werden. Angelehnt an (2, 5, 6).

NIS: Natrium-Iodid-Symporter, PDS: Pendrin, TPO: Thyreperoxidase, Tg: Thyroglobulin, MIT: Monoiodiertes Tyrosin, DIT: Diiodiertes Tyrosin, T3: Triiodthyronin, T4: Thyroxin.

## 1.2. Natrium-Iodid-Symporter und Pendrin

Sowohl NIS als auch PDS sind Proteine in der Zellmembran von Thyreozyten und bestehen jeweils aus hydrophoben Membrandomänen und einer hydrophilen zytosolischen Domäne (10, 11). NIS gehört zur Familie der Natrium/Solute Carrier 5A Proteine (SLC5A5). Der humane NIS (hNIS) besteht aus 643 Aminosäuren. Experimente zur Untersuchung der Sekundärstruktur von NIS deuten darauf hin, dass hNIS ein Glykoprotein ist, das 13 transmembran-Helices ausbildet, wobei der Carboxy-Terminus intrazellulär und der Amino-Terminus extrazellulär lokalisiert ist (3-6). Die drei N-Glykosylierungsstellen sind weder für den Iodid-Transport noch für die Stabilität, Aktivität

oder den Transport des NIS-Proteins zur Plasmamembran zwingend erforderlich (4, 5, 8). Das Thyreoidea-stimulierende Hormon (TSH) stellt einen wichtigen Modulator der NIS-Biosynthese, -Transkription und -Aktivität dar (3, 4, 8).

PDS ist ein Mitglied der SLC26A-Anionenkanalfamilie und besteht aus insgesamt 780 Aminosäuren. Studien deuten darauf hin, dass die Sekundärstruktur des Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauschers PDS, dessen Amino- und Carboxy-Termini im Zytosol liegen, 12 Transmembrandomänen ausbildet. Es befindet sich an der apikalen Membran von Schilddrüsenepithelzellen und vermittelt den Ausstrom von Iodid aus den Thyreozyten in das Follikellumen. PDS findet sich nicht nur in der Schilddrüse, sondern auch in der Niere und im Innenohr. Ähnlich wie bei NIS reguliert TSH den normalen Ausstrom von Iodid über die apikale Membran der Schilddrüsenfollikelzellen (4-6). Mutationen von NIS oder PDS sind mit einem abnormalen Iodid-Einstrom/-Ausstrom assoziiert, was zu einer Schilddrüsen-Dyshormonogenese führt (12).

### **1.3. Autoimmunerkrankungen**

Die Inzidenz von Autoimmunerkrankungen und Allergien in den Industrieländern steigt stetig. Eine Assoziation mit einem zunehmenden Hygienestatus in jungen Jahren bzw. einer Verringerung der Häufigkeit von Infektionen und die Bedeutung der angeborenen Immunrezeptoren, insbesondere der Toll-like-Rezeptoren in der Vermittlung der schützenden Wirkung von Pathogenen auf die Autoimmunität, wird beschrieben (13). Auch eine Zunahme von endokrinen Chemikalien in der Ernährung und in der Umwelt (14), als auch ein Mangel an Mikronährstoffen wie Vitamin D (15) oder Selen (16), tragen zu dieser Entwicklung bei. Neue Risiken für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen stellen auch die neu entwickelten Ansätze in der Therapie gegen Krebs mit Immuncheckpoint-Inhibitoren, die gezielt das Immunsystem bzw. die T-Zellen zur Bekämpfung von Tumorzellen aktivieren, dar (17-19). Die Schilddrüsendysfunktion ist die häufigste endokrine und immunologische Nebenwirkung der Checkpoint Inhibitoren (20).

### **1.4. Chronische Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse**

Die Schilddrüse des Menschen stellt eines der am häufigsten von Autoimmunerkrankungen betroffenen Organe dar. Diese Autoimmunerkrankungen umfassen eine heterogene Gruppe von endokrinen Funktionsstörungen der Schilddrüse mit geschlechtsspezifischen Unterschieden (21). Die Ursache der höheren Prävalenz bei Frauen im Vergleich zu Männern ist noch ungeklärt.

Allerdings wurden eine genetische Prädisposition, Umweltfaktoren (22), genetische Polymorphismen (23), eine Beteiligung von Östrogenrezeptoren-beta (24) und die Versorgung mit Mikronährstoffen wie Selen (25) als Einflussfaktoren beschrieben. Darüber hinaus zeigen sich starke regionale Unterschiede in der Inzidenz und Prävalenz von Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse (21).

Zu den Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse gehören der Morbus Basedow (MB), der in Folge von stimulierenden TSH-Rezeptor-Autoantikörpern (TSHR-aAk) zur Hyperthyreose führt und die Hashimoto Thyreoiditis (HT), auch bekannt als autoimmun-lymphozytäre, infiltrative Thyreoiditis, die initial mit einer Hyperthyreose in Rahmen einer Hashitoxikose einhergehen kann und im Verlauf häufig eine Hypothyreose verursacht (26, 27). TSHR-aAk stellen Autoantikörper (aAk) des MB dar, die für die Diagnose entscheidend sind (28, 29). Diese können sowohl stimulierende als auch hemmende Wirkung aufweisen und üben so einen direkten Einfluss auf die Schilddrüsenaktivität und folglich den Hormonstatus aus (30). Die Mehrheit der Patienten mit HT zeigen zirkulierende Autoantikörper gegen Thyreoperoxidase (TPO-aAk) oder Thyreoglobulin (Tg-aAk). Diese sind allerdings nicht krankheitsspezifisch, da sie auch in Untergruppen von Patienten mit MB sowie bei gesunden Probanden, wenn auch in relativ niedrigen Konzentrationen, nachweisbar sein können (31).

Die Diagnose von HT und MB stellt oft eine Herausforderung dar, da sich Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse als dynamische Krankheiten mit individuellen Merkmalen und Verläufen präsentieren (19). Zur Diagnosestellung werden das klinische Erscheinungsbild, die sonographische Darstellung der Schilddrüse und das Vorhandensein von aAk gegen thyreoidale Strukturen im Serum herangezogen. In seltenen Fällen kann auch die Aufnahme von radioaktivem Iod sowie die zytologische Untersuchung von Schilddrüsenbiopsaten in Betracht gezogen werden (27). Abhängig von den akuten Symptomen und den laborchemischen Parametern stehen Thyreostatika, wie Methimazol, Carbimazol, Propylthiouracil etc. für die Therapie des MB zur Verfügung. Eine kausale Therapie stellen die totale bzw. subtotale Thyreoidektomie bzw. die interventionelle Radioiodtherapie dar. Zur symptomatischen Behandlung der Hyperthyreose werden häufig Betablocker eingesetzt (32). Im Gegensatz dazu, stellt die personalisierte Thyroxin (T4)-Substitution die Therapie der Wahl des hypothyreoten Zustand der HT dar (19).

## **1.5. NIS- und PDS-Autoantikörper bei schilddrüsenerkrankten Patienten**

Obwohl die Grundpfeiler der Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse bekannt sind, variiert die Prävalenz von autoimmunvermittelten Erkrankungen in Abhängigkeit von Geschlecht, Alter, Herkunft (33) und epigenetischen Faktoren (34). Patienten mit autoimmunbedingten Erkrankungen der Schilddrüse leiden häufig an Polyautoimmunität (35), bei der klinische Hinweise auf die Koexistenz von mehr als einer Autoimmunerkrankung gegeben sind. TPO-, Thyreoglobulin- und TSH-Rezeptor-Autoantikörper gelten als essentielle diagnostische Biomarker bei autoimmunbedingten Schilddrüsenerkrankungen. Die Prävalenz und klinische Bedeutung von NIS- und PDS-aAk wurde in den letzten Jahren kontrovers diskutiert und ist umstritten (5, 8, 36). Erste Befunde legten nahe, dass PDS (37) und NIS (38-40) ein neues Autoantigen bei Patienten mit autoimmunbedingten Schilddrüsenerkrankungen darstellen. Neueste Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die Häufigkeit von NIS-aAk (36, 41, 42) und PDS-aAk (43, 44) bei Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse gering ist.

## **1.6. Zielsetzung der Arbeit**

Ziel dieser Studie ist es, die widersprüchlichen Befunde bezüglich der Prävalenz und diagnostischen Bedeutung von Autoantikörpern gegen die Iodidtransporter NIS und PDS bei Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen aufzuklären, indem ein großes und heterogenes Kollektiv von schilddrüsenerkrankten Patienten (n=323) und gesunden Kontrollpersonen (n=400) auf NIS- und PDS-aAk untersucht und verglichen wird.

## 2. Material und Methoden

Die im Folgenden dargestellten Materialien und Methoden wurden größtenteils bereits in der Publikation beschrieben (19).

### 2.1. Material

Die Vektoren pPICZa und pENTR223.1, die die NIS- (SLC5A5-Gen) bzw. PDS- (SLC26A4) cDNA tragen, wurden vom DNASU-Plasmid-Repository bezogen. Die DNA Primer P1 (ATA GAT ATC ATG GAG GCT GTC GAA ACC GGT GA), P2 (CGC GAA TTC CAA GTT AGT CTC TTG CTG AT), P3 (ACC ATG GCA GCG CCA GGC GGC) und P4 (GCG CAA TTG GGA TGC AAG TGT ACG CAT A) wurden von BioTeZ (Berlin, Deutschland) bestellt. Mit Hilfe dieser Primer wurde die NIS- (SLC5A5-Gen) bzw. die PDS-Sequenz (SLC26A4) amplifiziert. Mittels Restriktionsverdau und Ligation wurde die NIS- bzw. PDS-Sequenz in den Vektor pIRESneo eingebracht. Die Amplikons wurden isoliert, sequenzverifiziert und N-terminal zu Firefly-Luciferase in pIRESneo-LUC eingefügt, wodurch die Expressionsvektoren pIRESneo-NIS-Luc und pIRESneo-PDS-Luc gebildet wurden. Für die Validierung wurden kommerzielle Antikörper gegen humanes NIS (ab 101084, Abcam) und humanes PDS (PA5-42060, Thermo Fischer Scientific) erworben. Die Immunpräzipitation von aAk-Komplexen, die Transporter-Lucifusionsproteine binden, erfolgte mittels Protein A Sepharose (ASKA Biotech GmbH, Hennigsdorf, Deutschland) wie beschrieben (45).

### 2.2. Humane Proben

Insgesamt wurden, wie beschrieben (46), 323 Serumproben von Schilddrüsenpatienten einer Gemeinschaftspraxis in Berlin, Deutschland, gesammelt. Die Diagnosen von MB, HT oder anderen Schilddrüsenerkrankungen wie nicht-autoimmun- bzw. iatrogen-bedingte Hypothyreose (Hypo), Struma nodosa (STRN), Schilddrüsenkarzinom (SCa) und Thyreoiditis de Quervain (TdQ) basierten auf der klinischen Präsentation und den Krankheitsparametern gemäß der Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (ICD-10). TPO-aAk- und TSHR-aAk-Analysen sowie die Bestimmung des Selen (Se)- und Zink (Zn)-Status wurden kürzlich beschrieben (46). Um einen Querschnittsüberblick zu erhalten, wurde eine Gesamtsumme von 400 Serumproben gesunder Probanden von einem kommerziellen Anbieter (in.vent Diagnostica GmbH, Hennigsdorf, Deutschland) bezogen. Die Altersverteilung in Jahren innerhalb der Kohorte konnte wie folgt bestimmt werden (MW±SD bzw. Median (IQR)):

Frauen 29,1±8,9 bzw. 27 (22, 35) und Männer 34,9±8,9 bzw. 35 (28, 41). Die grundlegenden Parameter der Schilddrüsenerkrankten und Gesunden sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die klinischen Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Deklaration von Helsinki durchgeführt und von der ethischen Prüfungskommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt (#EA2/173/17). Die schriftliche Einwilligung wurde von jedem Patienten nach vollständiger Aufklärung über Zweck und Art aller angewandten Verfahren eingeholt. Die Laboranalysen wurden von Forschern durchgeführt, die für den Gesundheitsstatus der Probanden verblindet waren.

**Tabelle 1:** Studiendesign. Klinische Parameter der Schilddrüsenerkrankten und gesunden Kontrollen.

	Total (n)	Geschlecht		Alter*	Subgruppen Schilddrüsenerkrankten					
		w	m		HT	MB	Hypo	STRN	SCa	TdQ
<b>Erkrankte</b>	323	278	45	50,7 (38,3-63,5)	107	73	61	61	17	4
<b>Kontrolle</b>	400	200	200	31,0 (24,0-39,0)						

\*medianes Alter [Jahre] mit 25. - 75. Perzentile in Klammern (IQR), w: weiblich, m: männlich, HT: Hashimoto Thyreoiditis, MB: M. Basedow, Hypo: Hypothyreose (nicht-autoimmun-/ iatrogen-bedingt), STRN: Struma nodosa, SCa: Schilddrüsenkarzinom, TdQ: Thyreoiditis de Quervain.

### 2.3. Expression von NIS-Luc und PDS-Luc in HEK293-Zellen

Die Expressionsvektoren pIRESneo-NIS-Luc und pIRESneo-PDS-Luc wurden in HEK293-Zellen transfiziert und in DMEM/F12 mit 10 %(v/v) Fetal Bovine Serum (FBS) und 1 %(v/v) Penicillin/Streptomycin gezüchtet. Zwei Tage nach der Transfektion wurden 0,8 mg/mL des Aminoglykosid-Antibiotikums Geneticin (G-418) dem Kulturmedium zugegeben und stabile Klone, die die Fusionsproteine NIS-Luc bzw. PDS-Luc exprimieren, isoliert und gezüchtet. Die Selektion basierte auf den Wachstumseigenschaften der Zellen und der Luc Aktivität. Stabile Klone wurden für die Proteinproduktion expandiert, die Zellen wurden lysiert und durch Zentrifugation gereinigt und wie beschrieben (45) prozessiert. HEK293-Kulturen wurden in 165 cm<sup>2</sup> Platten bis zur Konfluenz gezüchtet und durch Ausschaben in PBS geerntet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1000 g) gesammelt und in PBS gewaschen, gefolgt von einer erneuten Zentrifugation (1000 g). Die resultierenden Pellets wurden in 20 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) Puffer (pH 7,5) bestehend aus 50 mM NaCl, 1 %(v/v) Triton X-100 und 10 %(v/v) Glycerin resuspendiert. Die resultierende Suspension wurde nochmals gereinigt (15 min, 4000 g), in Aliquots von 1,0 mL verteilt und bis zur Verwendung für die analytischen Messungen bei -80°C gelagert.



## **2.4. Testen der Serumproben auf NIS- und PDS-aAk durch Immunpräzipitation**

Die Zellextrakte, die rekombinantes NIS-Luc- oder PDS-Luc-Fusionsprotein enthielten, wurden in Inkubationspuffer verdünnt, der 50 mM Tris-HCl, 10 % (v/v) Glycerin, 100 mM NaCl, 5 % (w/v) Glucose, 5 % (w/v) Magermilchpulver, 1 % (v/v) Triton X-100 und 0,005 % (w/v) Natriumazid enthielt. Die Verdünnung wurde so eingestellt, dass ca. 5000 RLU/ $\mu$ L Extrakt erzeugt werden konnten. Immunpräzipitationen wurden durch Inkubation von 5,0  $\mu$ L Serumprobe mit 40  $\mu$ L Extrakt über Nacht bei 4°C gestartet. Am nächsten Tag wurden 40  $\mu$ L 20 % (v/v) Protein A Sepharose zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Ausfällen der Immunkomplexe erfolgte durch Zentrifugation. Die Pellets wurden fünfmal mit 200  $\mu$ L Puffer (bestehend aus Tris, NaCl, Triton) gewaschen. Die Luciferaseaktivität wurde für 5s mittels Lumineszenz mit Hilfe von Luciferin (Sigma) in einem Luminometer (Berthold) bestimmt. Die Ergebnisse wurden als relative Lichteinheiten (RLU) aufgezeichnet und die Bindungsindizes (BI) wurden in Bezug auf den arithmetischen Mittelwert (MW) der unteren Hälfte aller Signale an unabhängigen Tagen ermittelt. Zur Identifizierung von Probanden mit positiven aAk-Konzentrationen wurden zwei verschiedene Methoden angewandt, wie bereits beschrieben (47, 48). Als Schwellenwert der Positivität wurden Signale, die das 75. Perzentil plus anderthalb Interquartilabstände ( $P75+1,5*IQR$ ) überstiegen oder die den MW der unteren 90% aller Signale plus drei Standardabweichungen ( $MW+3SD$ ) überstiegen, festgelegt. Beide Methoden lieferten vergleichbare Ergebnisse. Die Reproduzierbarkeit der Assays wurde mit positiven Proben in verschiedenen Verdünnungen überprüft. Der durchschnittliche Intra-Assay-Variationskoeffizient (CV) betrug 7,3 % für NIS-aAk und 3,4 % für PDS-aAk, der Inter-Assay-Variationskoeffizient betrug 7,3 % für NIS-aAk bzw. 5,6 % für PDS-aAk.

## **2.5. Statistische Auswertung**

Die statistischen Analysen wurden mittels SPSS (Version 25, SAS Institute, Cary, NC, USA) oder GraphPad Prism v.7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als  $MW\pm SD$  oder Median und Interquartilsbereiche (IQR) dargestellt. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test analysiert. Der Vergleich von quantitativen Variablen zwischen zwei unabhängigen Gruppen wurde mit einem ungepaarten t-Test (normalverteilte Daten) oder einem zweiseitigen nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Multiple Vergleiche wurden mittels ANOVA durchgeführt. Die Korrelationen wurden mittels Pearson-Korrelationstest (normalverteilte Daten) oder Spearman's

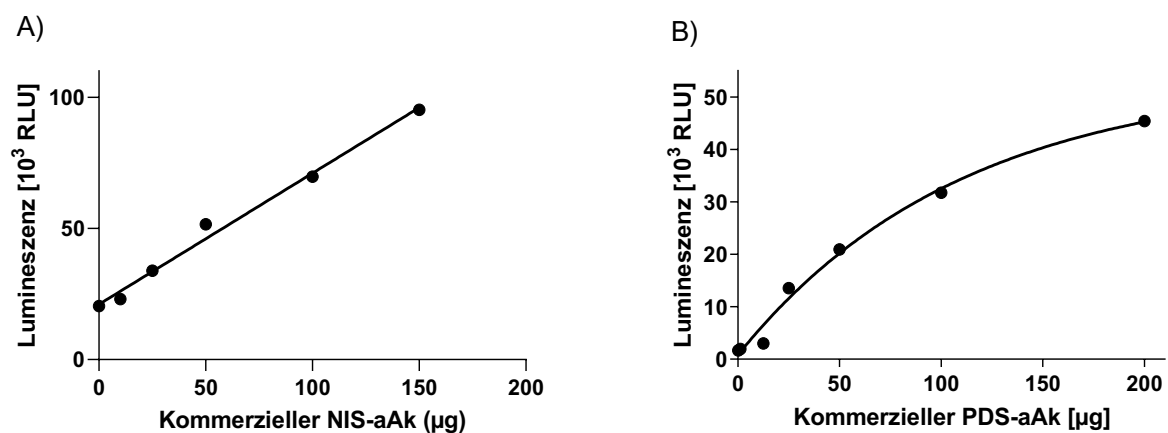
Rangkorrelationstest durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mit \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 oder \*\*\*P < 0,001 angegeben.

### 3. Ergebnisse

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse dieser Studie wurden bereits in der Publikation beschrieben (19).

#### 3.1. Expression von NIS-Luc und PDS-Luc in HEK293-Zellen

Die Expressionsplasmide, die für die Fusionsproteine NIS-Luc und PDS-Luc kodieren, wurden in HEK293-Zellen transfiziert. Stabile Klone wurden hergestellt, expandiert und die Fusionsproteine angereichert. Mittels Messung der Luc Aktivität wurde die erfolgreiche Expression kontrolliert. Zur Validierung des Antikörper-Immunopräzipitations-Assays wurden kommerzielle Antikörper, die humanes NIS (Abbildung 2A) bzw. humanes PDS (Abbildung 2B) erkennen, verwendet. Die schrittweise Verdünnung von NIS- und PDS-positiven Antikörperseren zeigte dosisabhängige Reaktionen auf Antikörperkonzentrationen über einen weiten Verdünnungsbereich, was auf geeignete Detektionsbedingungen für die Quantifizierung von NIS- und PDS-spezifischen-aAk hinweist.

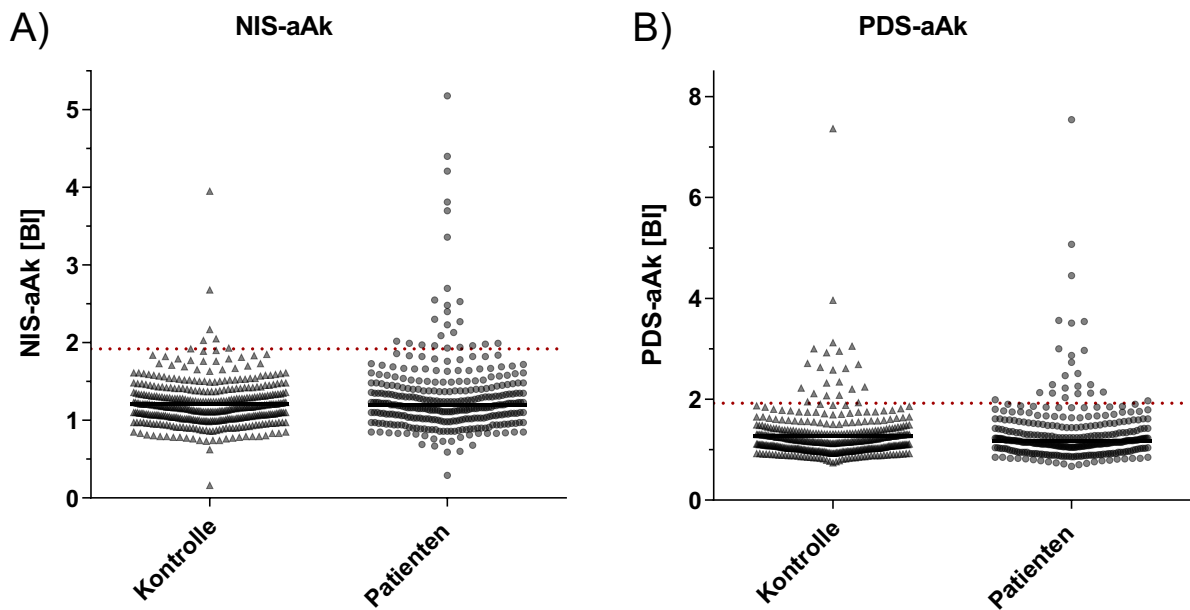


**Abbildung 2:** Charakterisierung von neuartigen Assays für NIS- und PDS-spezifische Autoantikörper. Stabile HEK293-Zellen, die Fusionsproteine von NIS-Luc bzw. PDS-Luc exprimieren, wurden generiert und zur Etablierung analytischer Tests für Autoantikörper (aAk) gegen diese Iodidtransporter verwendet. Signalspezifität und -linearität wurden mittels kommerziellen Antikörpern getestet, die humanen NIS (A) bzw. humanen PDS (B) erkennen. Figure 1 in (19).

### **3.2. Analyse der Serumproben von Kontrollen und Schilddrüsenpatienten auf aAk gegen NIS und PDS**

Um die Prävalenz von aAk gegen NIS und PDS bei erwachsenen Probanden zu bestimmen, wurden Proben aus zwei unabhängigen Querschnittssammlungen von Seren analysiert. Die Kohorte gesunder Kontrollpersonen bestand aus insgesamt 400 Probanden (50 % weiblich) und die Kohorte der Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen, die eine Ambulanz zur Schilddrüsensprechstunde aufsuchten, bestand aus 323 Probanden (86 % weiblich). Autoantikörper-positive Proben wurden anhand des Binding Index (BI) und der Ausreißerkriterien identifiziert; d. h. wenn die Signale einen  $BI > 1,92$  ( $P75 + 1,5 * IQR$ ) bzw.  $BI > 1,83$  ( $MW + 3SD$ ) überschritten, wurden diese Seren als positiv identifiziert. Alle 723 Seren ( $n=400$  gesunde Kontrolle,  $n=323$  Schilddrüsenerkrankte) wurden in die Berechnungen einbezogen, um den Schwellenwert für die Positivität im NIS- bzw. PDS-aAk-Assay zu bestimmen. Unter Berücksichtigung des oberen Schwellenwertes waren insgesamt sieben Serumproben in der Kohorte der gesunden positiv, was einer Prävalenz von 1,8 % entspricht. Fünf Proben entstammten Frauen, zwei Männern. Im Vergleich zu den Kontrollen traten NIS-aAk bei Schilddrüsenpatienten häufiger auf (Prävalenz von 7,7 % (25 von 323 Schilddrüsenerkrankten)) (Abbildung 3A). Auch hier zeigte sich der für Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse typische geschlechtsspezifische Unterschied in der Häufigkeit, mit einer Verteilung für NIS-aAk von 1:24 (männlich: weiblich) unter den Schilddrüsenpatienten.

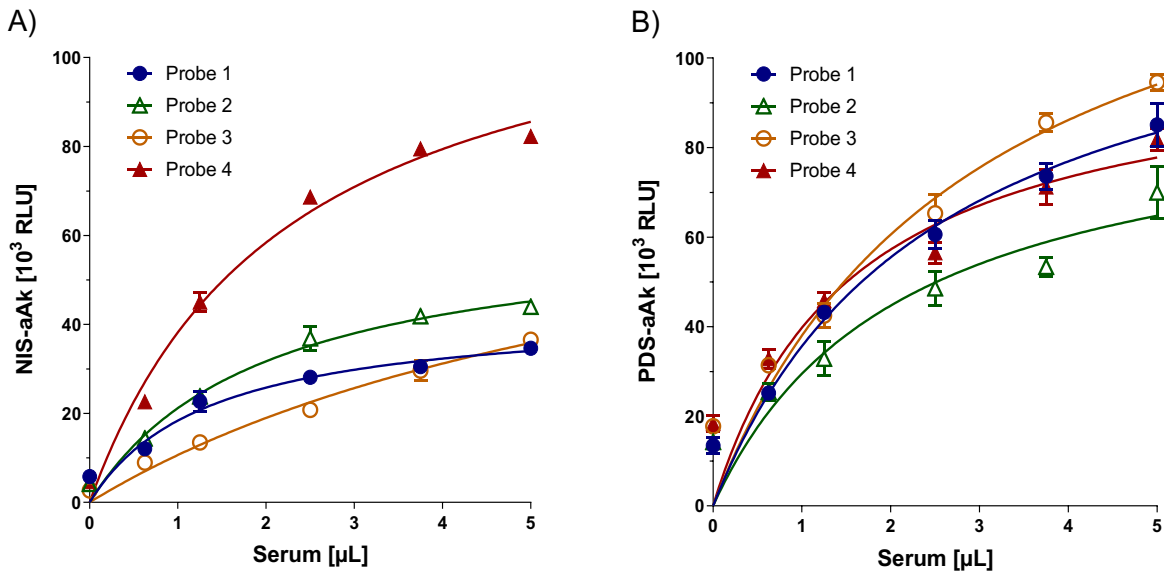
Mit der gleichen Strategie, wie oben beschrieben, wurden auch alle 723 Serumproben auf Antikörper gegen den apikalen Transporter der Thyreozyten PDS getestet. Dabei wurde ein Schwellenwert von  $BI > 1,97$  bzw.  $BI > 1,87$  berechnet. Unter Berücksichtigung von diesem Cut-Off wurden insgesamt 20 von 400 gesunden Kontrollen bzw. 25 von 323 Schilddrüsenpatienten als positiv für aAk gegenüber humanes PDS erkannt, was einer Prävalenz für PDS-aAk von 5,0 % bzw. 7,7 % entspricht (Abbildung 3B). Dabei zeigte sich ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der gesunden Kohorte im Vergleich zur erkrankten. Im Detail zeigte sich eine Verteilung für PDS-aAk Positivität von 12:8 (männlich:weiblich) innerhalb den gesunden Kohorte, während sich bei den Erkrankten eine Verteilung von 4:21 zeigte.



**Abbildung 3:** Prävalenz von NIS- und PDS-aAk bei gesunden Probanden (Kontrolle) und Schilddrüsenpatienten. Eine Kohorte von Kontrollpersonen ( $n=400$ ) und Schilddrüsenpatienten ( $n=323$ ) wurden auf NIS-aAk (A) bzw. PDS-aAk (B) analysiert. Es wurden Ausreißerkriterien angewendet, um Serumproben als positiv oder negativ zu klassifizieren. Die gestrichelten Linien zeigen die Schwellenwerte für Positivität an (NIS-aAk  $BI > 1,92$  bzw. PDS-aAk  $BI > 1,97$ ). Figure 2 in (19).

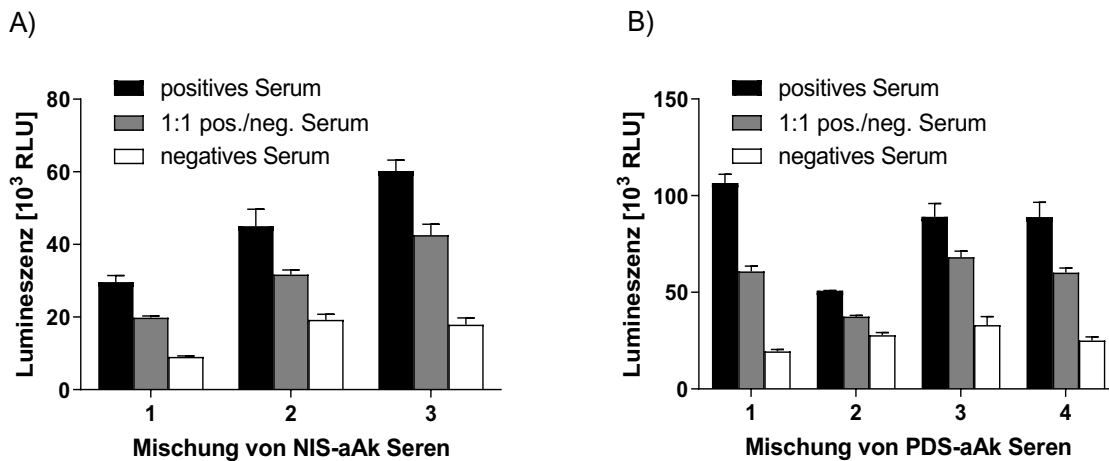
### 3.3. Analyse der aAk-Eigenschaften in Serumproben zur Validierung des NIS- und PDS-aAk-Assays

Es wurden serielle Verdünnungen in Inkubationspuffer von aAk-positiven Seren durchgeführt, mit dem Ziel die aAk und das Serum als Matrix für die durchgeführten Tests zu charakterisieren. Dazu wurden jeweils vier verschiedene für humane NIS-aAk positive Seren (Abbildung 4A) und PDS-aAk positive Seren (Abbildung 4B) ausgewählt. Diese Proben wurden folglich in 1,0-, 0,75-, 0,5-, 0,25- und 0,125-facher Verdünnung der Originalprobe getestet, welche 5, 3,75, 2,5, 1,25 und 0,625  $\mu\text{L}$  Originalserum pro Reaktion entsprachen. Es erfolgte eine Serum- und aAk-freie Messung zur Kontrolle (0  $\mu\text{L}$ , Abbildung 4). Die Analyse der Ergebnisse zeigte eine verdünnungsabhängige schrittweise Abnahme der Signalstärken. Eine konzentrationsabhängige Messung von NIS- und PDS-Autoantikörper durch den Assay konnte dadurch nachgewiesen werden.



**Abbildung 4:** Charakterisierung der Signallinearität von NIS- und PDS-aAk in positiven Serumproben. Serielle Verdünnungen von NIS-aAk- (A) und PDS-aAk-positiven (B) Serumproben. Die Signale sind als relative Lichteinheiten (relative light units RLU) in Bezug auf die schrittweise Verdünnung des ursprünglichen Serumproben Volumens von 5 µL aufgezeichnet. Figure 3A und 3B in (19).

Um diese Ergebnisse zu validieren und mögliche Matrixeffekte zu identifizieren, wurden volumengleiche Mischungen einer positiven und einer negativen Probe kombiniert und auf NIS-aAk (Abbildung 5A) und PDS-aAk (Abbildung 5B) untersucht. Die Ergebnisse dieser Messungen stimmten mit dem erwarteten arithmetischen Mittelwert der Signale beider Proben überein. Daraus lässt sich schließen, dass der Assay bzw. die erhaltenen Signale nicht durch die Matrix beeinträchtigt wurden.

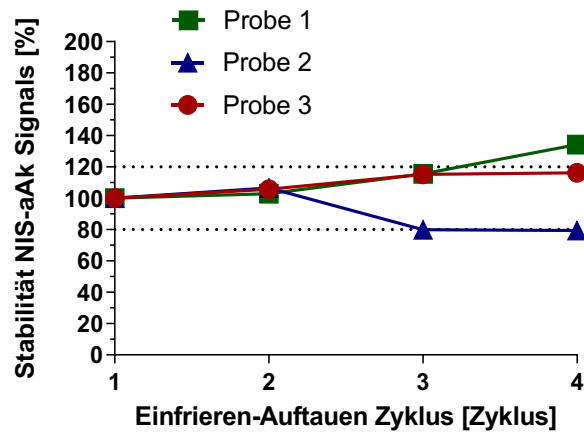


**Abbildung 5:** Charakterisierung von NIS- und PDS-aAk in Serumproben über Kombinations-Serumanalytik. Kombinationen aus gleichen Volumina aAk-positiver und aAk-negativer Serumproben wurden auf Matrixeffekte getestet. Die Signale, die von der 1:1 Mischung der Proben für NIS-aAk (A) bzw. PDS-aAk (B) aufgezeichnet wurden, entsprachen den arithmetischen Mittelwerten dieser Proben. Figure 3C und 3D in (19).

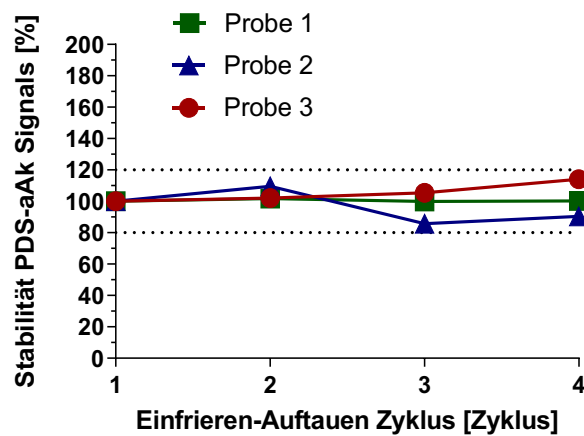
### 3.4. Stabilität des NIS- und PDS-aAk Signals im Serum nach mehrfachen Zyklen des Einfrierens und Auftauens

Um die Probenstabilität der aAk im Serum zu testen, wurden 5  $\mu$ L dreier ausgewählter Seren in vierfacher Wiederholung Einfrier- und Auftauzyklen unterzogen, d.h. 1 h bei  $-80^{\circ}\text{C}$  und 1 h bei Raumtemperatur. Es wurde ersichtlich, dass sowohl NIS-aAk als auch PDS-aAk eine Temperaturstabilität aufwiesen. Der mehrfache Wechsel der Temperaturen zeigte bis zur dritten Wiederholung keinen ersichtlichen Einfluss auf die Messergebnisse, das heißt die absolute Messabweichung lag unter bzw. gleich 20 %. Aber von insgesamt sechs Proben wies nur eine Probe nach vier Zyklen eine Abweichung der Signalstärke von mehr als 20 % des ursprünglichen Zustands auf (Abbildung 6A und Abbildung 6B).

A)



B)



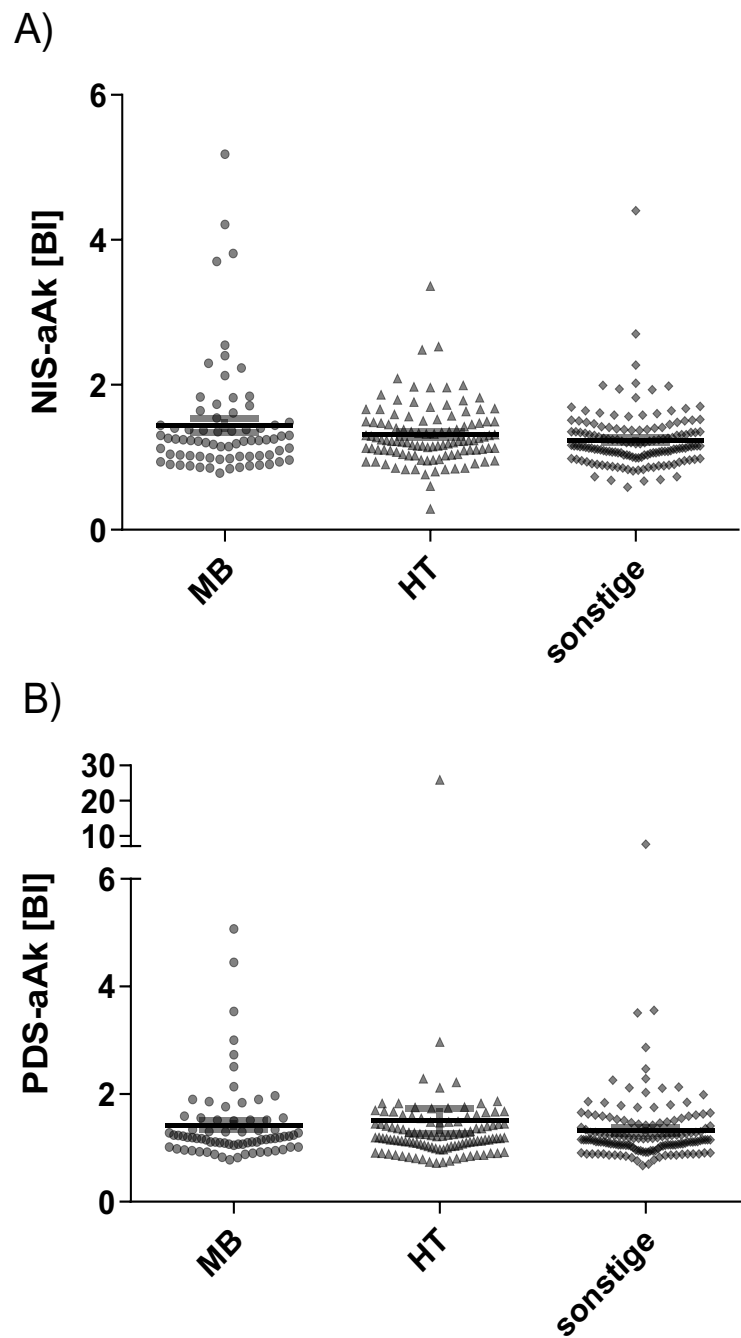
**Abbildung 6:** Test auf Signalstabilität bei wiederholten Zyklen des Einfrierens und Auftauens von Serumproben. Es wurden jeweils drei Proben, die positiv für NIS-aAk (A) bzw. PDS-aAk (B) waren, auf die Signalstabilität bei Gefrier-/ Auftauzyklen getestet. Fünf von sechs Proben lieferten stabile Signale nach vier Gefrier-Auftau-Zyklen und ergaben Signale im Bereich von  $100 \pm 20\%$  der ursprünglichen Probe. Figure 4 in (19).



### 3.5. Verteilung von NIS-aAk und PDS-aAk bei Schilddrüsenerkrankungen

Wir analysierten die Prävalenz von NIS-aAk und PDS-aAk in den unterschiedlichen Subgruppen der Schilddrüsenerkrankten. Die Unterteilung der Schilddrüsenpatienten (n=323) erfolgte in HT (n=107), M. Basedow (n=73) und einer dritten Gruppe bei Nichtzuordnung in eine der zuvor erwähnten Gruppe (n=143). Zur dritten Gruppe zählten Patienten mit Struma nodosa, nicht-autoimmun- bzw. iatrogen-bedingter Hypothyreose, Schilddrüsenkarzinom und Thyreoiditis de Quervain. Unter den 25 für NIS-aAk positiven Serumproben (7,7 % aller Schilddrüsenpatienten) zeigte sich eine relativ hohe Prävalenz von 12,3 % bei M. Basedow Patienten (n=9), gefolgt von 7,5 % bei Hashimoto Thyreoiditis Patienten (n=8) und 5,6 % in der dritten Gruppe (n=8) (Abbildung 7A). Nur ein männlicher Patient wurde positiv für NIS-aAk gefunden, was ein Männer-Frauen-Verhältnis von 1:24 ergibt. Interessanterweise zeigte genau dieser Patient die höchste NIS-aAk-Konzentration (BI von 5,2) innerhalb der gesamten Kohorte auf.

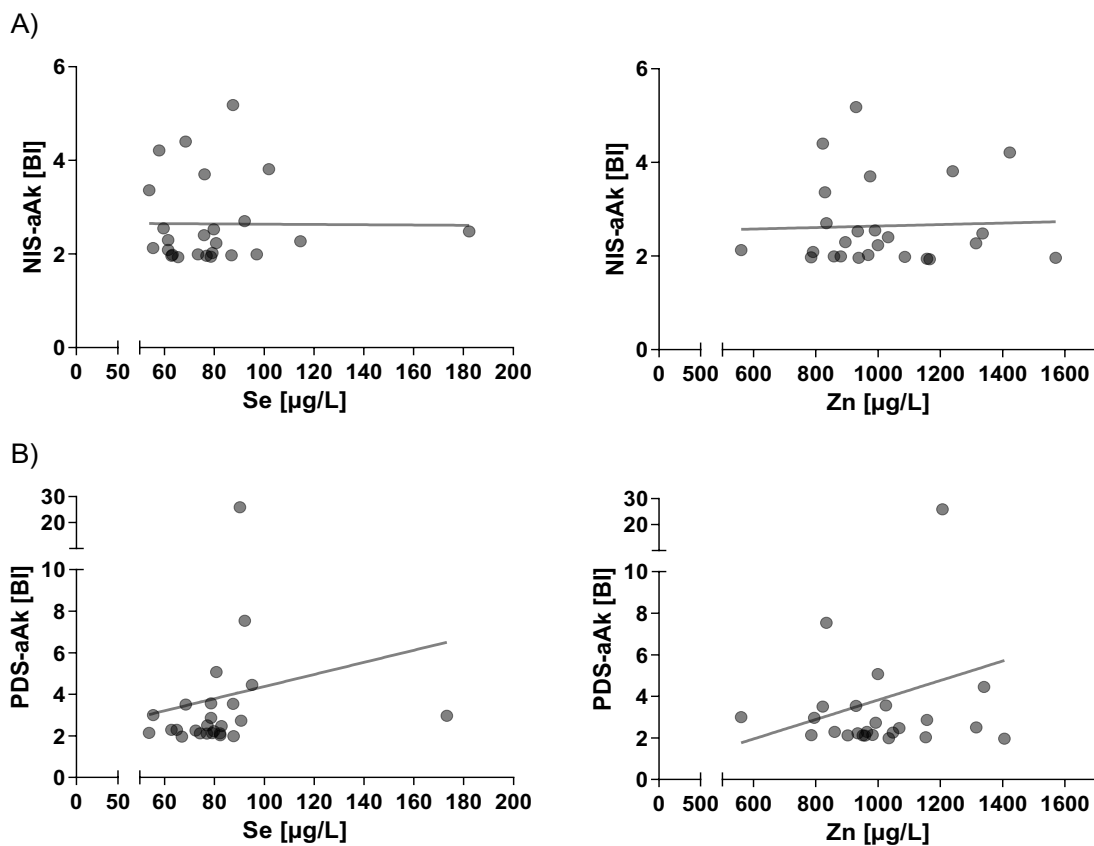
Insgesamt konnte in 25 Proben der Autoantikörper gegen PDS nachgewiesen werden. Es zeigte sich also eine gleiche Prävalenz von 7,7 % wie bei NIS. Ähnlich zu NIS zeigte sich unter den Patienten mit M. Basedow (n=8, d. h. bei 11,0 % der MB Patienten) eine höhere Prävalenz als bei HT (n=5, d. h. bei 4,7 % der HT Patienten). Bei der dritten Gruppe lag die Prävalenz dazwischen (n=12 von 143, d. h. 8,4 %) (Abbildung 7B). Die geschlechtsspezifischen Unterschiede für PDS-aAk unter den Schilddrüsenpatienten entsprachen dem allgemeinen Verhältnis von Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse in der Bevölkerung mit einer höheren Häufigkeit unter Frauen. Genauer gesagt zeigte sich ein Verhältnis für PDS-aAk von Männern zu Frauen von ca. 1:5. Es bestand kein großer Unterschied in der Altersspanne der Patienten, die als positiv oder negativ für NIS-aAk bzw. PDS-aAk identifiziert wurden; NIS-aAk positive versus negative Patienten (MW±SD in Jahren; 49,7±18,2 vs. 51,5±6,0) bzw. PDS-aAk positive vs. negative Patienten (MW±SD in Jahren; 51,2±18,7 vs. 51,4±15,9). Kein Unterschied zeigte sich auch bei den Schilddrüsenparametern TSH oder fT4 der Patienten, die als positiv oder negativ für die oben genannten Autoantikörper identifiziert wurden.



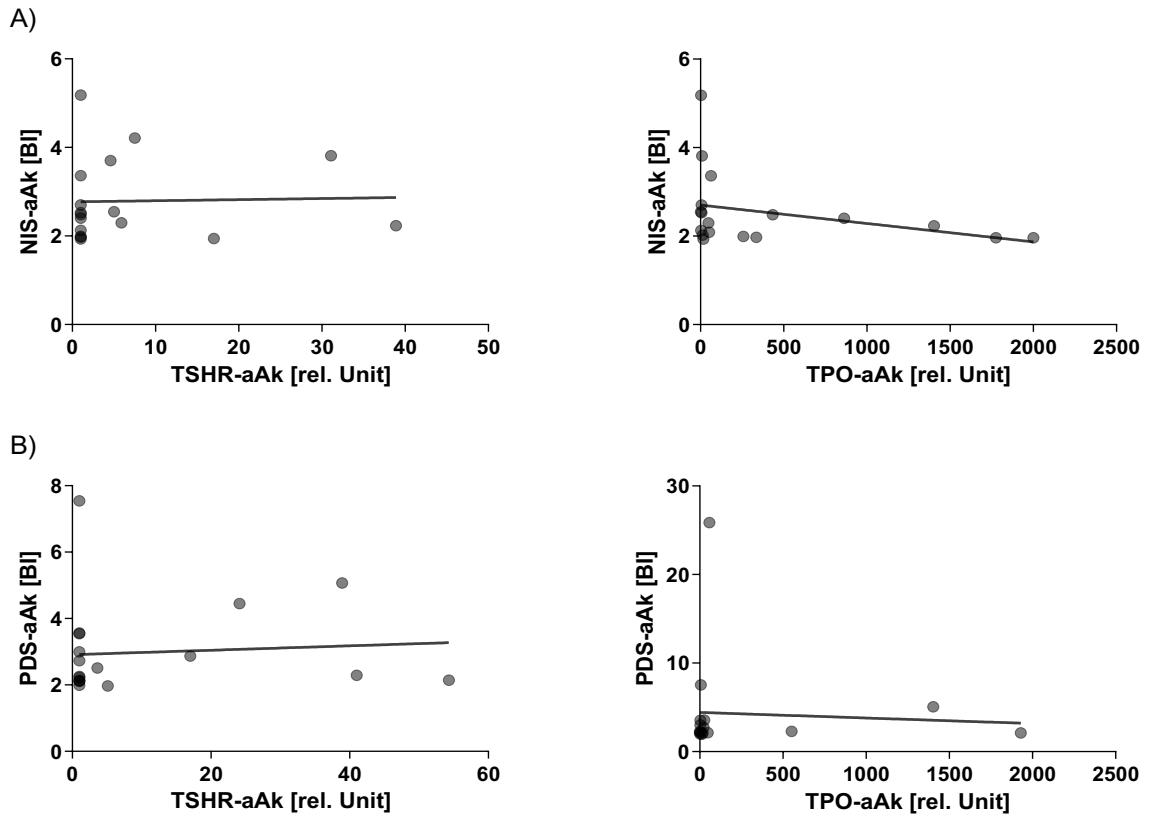
**Abbildung 7:** Prävalenz von NIS-aAk (A) und PDS-aAk (B) bei Schilddrüsenerkrankten. Die Kohorte der Schilddrüsenerkrankten wurde in Patienten mit M. Basedow- (MB), Hashimoto-Thyreoiditis- (HT) und sonstigen (zusammengesetzt aus Struma nodosa, Hypothyreose (nicht-autoimmun-/ iatrogen-bedingt), Schilddrüsenkarzinom und Thyreoiditis de Quervain) Patienten unterteilt. Figure 5 in (19).

### 3.6. NIS-aAk und PDS-aAk im Zusammenhang mit Mikronährstoffen und anderen Autoantikörpern

Um einen möglichen Zusammenhang vom Zink- (Zn) und Selenstatus (Se), als auch der mit Schilddrüsenerkrankungen assoziierten Autoantikörper TSHR-aAk und TPO-aAk mit der Konzentration von NIS-aAk (Abbildung 8A) (Abbildung 9A) und PDS-aAk (Abbildung 8B) (Abbildung 9B) zu eruieren, wurden diese getestet bzw. analysiert. Eine signifikante Korrelation konnte in keinem Fall beobachtet werden.



**Abbildung 8:** Verhältnis von NIS-aAk und PDS-aAk zum Selen- und Zinkstatus. Serumproben von Probanden mit positivem NIS-aAk (A) und positivem PDS-aAk (B) wurden in Hinblick auf den Serum-Selen (Se) und Serum-Zink (Zn) Status analysiert. Es wurden keine signifikanten Wechselwirkungen beobachtet. In Figure 6A und 6B in (19).



**Abbildung 9:** Verhältnis von NIS-aAk und PDS-aAk zu den TSHR-aAk und TPO-aAk. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen NIS-aAk (A) und PDS-aAk (B) und den TSHR-aAk oder TPO-aAk Werten. In Figure 6C in (19).

## 4. Diskussion

Ziel dieser Dissertation war es, einen analytischen Assay zur Quantifizierung von NIS-aAk und PDS-aAk aus kleinen Aliquots von Humanserumproben bzw. einen neuen Assay geeignet zur Durchführung von epidemiologischen Studien zu entwickeln. In Anbetracht der steigenden Inzidenz von Autoimmunerkrankungen, deren genaue Ursache noch ungeklärt ist, stellt dieser Assay eine Basis für zukünftige Studien dar. Hierdurch können die potentielle diagnostische Rolle von NIS-aAk und PDS-aAk bei Schilddrüsenpatienten über große analytische Studien besser aufgeklärt, und die potentiellen Assoziation mit Ernährungsfaktoren, Umweltfaktoren, endokrin wirksamen Chemikalien, wie organischen Chlorverbindungen und Pestiziden (49), aber auch neuen medikamentösen Ansätzen in der Krebstherapie, gezielt analysiert werden.

Mit dem Ziel der Validierung dieses nicht radioaktiven Assay wurden eine Reihe wichtiger Experimente durchgeführt, die die Qualität des Assay unterstreichen konnten. Es konnte die Linearität der Signale zu Antikörperkonzentrationen aus Patientenserum und kommerziellen Quellen, das Fehlen von Matrixeffekten auf die Signalstärken und die Stabilität gegenüber Gefrier- und Auftauzyklen in den Experimenten bestätigt werden. Im Vergleich zu alternativen Tests stellt dieser neu entwickelte Assay kein aufwendiges, arbeitsintensives, mehrstufiges oder teures Verfahren dar. Auch die fehlende Anwendung von radioaktiven Isotopen erleichtert die Durchführung des Assay.

Die Prävalenz und die diagnostische Rolle von NIS-aAk und PDS-aAk war in den letzten Jahren immer wieder Gegenstand kontroverser Diskussionen. Initiale Experimente mittels Western Blot von Endo et al. (50) ergaben eine hohe Prävalenz der NIS-aAk von 84 % bei M. Basedow Patienten. Dieses Ergebnis legte nahe, dass die Mehrheit der MB Patienten Antikörper gegen NIS trägt bzw. die Inzidenz des NIS-aAk fast vergleichbar mit dem des TSHR-aAk bei der Erkrankung ist (50). Diese Annahme wurde durch die Studie von Brix et al. (36) bzw. Seissler et al. (42) unter Verwendung eines Radioliganden-Bindungsassay widerlegt. Hier konnten NIS-aAk bei nur 20 % bzw. 10,7 % der MB und 14 % bzw. 20,8 % der HT Patienten nachgewiesen werden, was auf eine niedrige diagnostische Wertigkeit dieses Autoantikörpers deutete.

In unserer Studie zeigte sich eine vierfach häufigere NIS-Autoimmunität bei den Patienten (7,7 %) in Vergleich zu den gesunden Probanden (1,8 %). Die Analyse der NIS-aAk-Prävalenz bei den Schilddrüsenpatienten mit MB bzw. HT zeigte bemerkenswerte Unterschiede auf. Autoantikörper gegen NIS wurden fast doppelt so häufig bei MB (12,3 %) als bei HT (7,5 %) nachgewiesen. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zeigte sich auch in den Studien von Brix et al. (36), Yoshida et al. (37), Morris et al. (38) und Endo et al. (50) eine höhere Prävalenz von NIS-aAk bei M. Basedow im Vergleich zu Hashimoto Thyreoiditis Patienten. Im Widerspruch dazu wurde von Seissler et al. (42) und Ajjan et al. (41) eine etwa gleich hohe NIS-aAk Prävalenz bei diesen Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse beschrieben. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass NIS ein relevantes Autoantigen bei autoimmunbedingten Erkrankungen der Schilddrüse darstellt. Besonders die höhere Prävalenz unter den M. Basedow Patienten stärkt diese Annahme. Im Einklang mit vorherigen Studien (36, 42, 51) scheinen allerdings die Autoantikörper gegen NIS als diagnostische Biomarker für Erkrankungen der Schilddrüse ungeeignet zu sein.

In der Studie von Yoshida et al. (37) wurde unter Anwendung der Technik von Immunoblotting PDS-aAk in 81 % der Fälle Erkrankter (97,5 % bei HT, 74 % bei MB) und 0 % der gesunden Kontrollen nachgewiesen. Aus diesen Ergebnissen wurde abgeleitet, dass PDS-aAk zur Diagnosestellung von autoimmunbedingten Schilddrüsenerkrankungen beitragen können. Allerdings konnte dies in der konsekutiven Studie von Kemp et al. (43) unter Verwendung eines Radioliganden-Bindungsassays nicht verifiziert werden. Im Detail zeigte sich eine Prävalenz der PDS-aAk bei Schilddrüsenerkrankten von nur 8,8 % (9,9 % bei MB vs. 7,6 % bei HT).

Die in unserer Studie vorgestellten Analysen zeigten eine Prävalenz der PDS-aAk bei Schilddrüsenpatienten von 7,7 %. Diese war mit 5,0 % nur geringfügig höher als in den Kontrollen. Ähnlich zu den Autoantikörpern gegen NIS traten PDS-aAk doppelt so häufig bei Patienten mit MB (11,0 %) als mit HT (4,7 %) auf. In Übereinstimmung mit anderen Studien, die Autoantigene in voller Länge als Detektor verwendet haben (z.B. Radioliganden-Bindungsassays (36, 43)), zeigte sich in unserer Studie eine insgesamt niedrige Prävalenz von PDS-aAk bei Schilddrüsenerkrankten. Es erscheint, dass der Bestimmung von PDS-aAk bei Schilddrüsenpatienten kein zusätzlicher diagnostischer Wert zugerechnet werden kann. Das Vorhandensein von PDS in Erkrankungen der Lunge (52), der Niere (53), der Plazenta (54) oder bei Rhinosinusitis (55) wurde in unterschiedlichen Studien beschrieben. Ob PDS-aAk eine mögliche Rolle bei den oben genannten Erkrankungen spielen, bedarf weiterer Forschung.

In Tabelle 2 sind die Prävalenzen der NIS-aAk und PDS-aAk der vorangegangenen Studien inklusive dieser Studie (19) zusammengefasst. Zusätzlich ist die Prävalenz beider Hauptformen der autoimmunbedingten Erkrankungen der Schilddrüse, d. h. des MB und der HT angezeigt. Als plausible Erklärung für die Diskrepanz der Prävalenz von NIS- und PDS-aAk zwischen den Studien erscheinen eine geringere Stichprobengröße sowie methodische Differenzen.

**Tabelle 2:** Übersicht über berichtete Prävalenzen von NIS-aAk und PDS-aAk in analytischen Studien. Table 1 in (19).

aAk	Kontrolle (%)	MB (%)	HT (%)	Patienten/Kontrolle	Studie (Referenzen)
NIS-aAk	0	84	15	46/10	(50)
NIS-aAk	0-10	0-63	0-25,9	54/20	(38)
NIS-aAk	0,6-3	5,6-10,7	6,9-20,8	249/165	(42)
NIS-aAk	0	22	24	78/40	(41)
NIS-aAk*	0	0	0	299/210	(51)
NIS-aAk	-	38	27,5	140/80	(37)
NIS-aAk**	0	20	14	93/230	(36)
NIS-aAk***	0			21/27	(56)
<b>NIS-aAk</b>	<b>1,8</b>	<b>12,3</b>	<b>7,5</b>	<b>323/400</b>	<b>Diese Studie (19)</b>
PDS-aAk	0,0	74	97,5	140/80	(37)
PDS-aAk	0,0	0,0	0,0	112/39	(44)
PDS-aAk	0,0	9,9	7,6	137/28	(43)
PDS-aAk**	0	13	8	93/230	(36)
<b>PDS-aAk</b>	<b>5,0</b>	<b>11,0</b>	<b>4,7</b>	<b>323/400</b>	<b>Diese Studie (19)</b>

\*Iodid-Aufnahmehemmungstest; \*\* Zwillingspaare; Keine Konkordanz für NIS-aAk oder PDS-aAk; \*\*\* BrustkrebspatientInnen, aAk: Autoantikörper, MB: M. Basedow, HT: Hashimoto Thyreoiditis.

NIS-aAk wurden in unserer Studie auch bei gesunden Probanden nachgewiesen; ein gegenteiliges Ergebnis zu einer Reihe von Studien, in denen keine Autoantikörper gegen den NIS-Transporter bei Gesunden identifiziert wurden (Tabelle 2) (36, 41, 50). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zeigte sich in der Studie von Seissler et al. (42) und Morris et al. (38) eine NIS-aAk Positivität in der Kontrolle. Analog zu den NIS-aAk und im Gegensatz zu allen vorherigen Studien aufgelistet in Tabelle 2 (36, 37, 43, 44) war in unserer Studie auch eine PDS-aAk-Positivität in der Kohorte der gesunden Probanden zu finden. Dieser Unterschied in den Ergebnissen kann auch hier mit der Größe unserer Kontrollgruppe, mit einer Gesamtzahl von 400 gesunden Probanden, mit der verwendeten Technik oder beidem kausal zusammenhängen. Über das Auftreten von gegen die

Schilddrüse gerichteten Autoantikörpern in scheinbar gesunden Probanden wurde auch in anderen Studien berichtet. Dieses wurde beispielsweise erfolgreich in Bezug auf TPO-aAk beschrieben, die in der Bevölkerung viel häufiger vorkommen als die Rate der autoimmunbedingten Schilddrüsenerkrankungen (33). Einige der gesunden TPO-aAk positiven Probanden entwickeln mit der Zeit autoimmunbedingte Erkrankungen der Schilddrüse. Eine mögliche genetische Prädisposition ist beschrieben (19, 57).

Die Größe der Kohorten gesunder Probanden und Patienten, die ausführliche Charakterisierung der verwendeten Assays, aber auch die synchrone Analyse von beiden Haupttransportern für Iodid, i.e. NIS und PDS, mit der gleichen Technologie im selben Labor unter gleichen Bedingungen stellen die Stärken unserer Studie da. Unser neu entwickelter luminometrischer Immunoassay stellt eine verlässliche, sensitive und reproduzierbare Messmethode zur Bestimmung der NIS-aAk- und PDS-aAk-Konzentration dar. Unter diesen Voraussetzungen ist es uns gelungen, das Vorhandensein von NIS- und PDS-aAk bei Schilddrüsenpatienten aber auch gesunden Kontrollen nachzuweisen und die relative Prävalenz von aAk gegen diese beiden Iodidtransporter der Schilddrüse zu ermitteln.

Die fehlende Charakterisierung der Rolle der identifizierten aAk in Bezug auf die Funktionalität der Iodidtransporter bzw. Iodidaufnahme als auch die Tatsache, dass die Probanden zu nur einem einzigen Zeitpunkt analysiert wurden, stellen Limitationen unserer Studie dar. In vorherigen Studien wurde die Auswirkung von NIS-aAk in Bezug auf die Iodidaufnahme analysiert. Die Analyse der Ergebnisse mehrerer Studien erbrachte, dass NIS-aAk nur selten die Aufnahme von Iodid in einem nachweisbaren Ausmaß beeinflussen (19, 40, 41, 51).

Die potenzielle prognostische Rolle von NIS-aAk bei Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse, aber auch der Stellenwert von NIS-aAk bei der Entstehung bzw. Pathogenese von Erkrankungen nicht nur der Schilddrüse, aber auch des Magens, der Speicheldrüsen und Malignomen, wie dem Mammakarzinom (6, 58, 59), bedürfen weiterer Forschung. Ob PDS als Autoantigen bei der Initiierung bzw. Aufrechterhaltung der Schilddrüsenautoimmunität eine Rolle spielt konnte hier nicht geklärt werden und bedarf weiterer wissenschaftlicher Forschung. Es erfordert funktionelle Analysen, um mögliche Auswirkungen der PDS-aAk auf den Iodid-Transport der Schilddrüse und auf die Funktionalität anderer PDS-exprimierender Organe bzw. Gewebe wie dem Innenohr, der Niere, dem Trophoblasten und dem Endometrium (37) zu ermitteln.



Zusammenfassend zeigte sich in dieser Studie eine höhere Prävalenz von NIS-aAk bei Schilddrüsenpatienten als bei Gesunden (7,7 % versus 1,8 %); insbesondere betraf dies Patienten mit M. Basedow (12,3 %). Im Unterschied dazu war die Prävalenz der PDS-aAk bei Schilddrüsenpatienten und gesunden Kontrollen ähnlich (7,7 % versus 5,0 %). Unsere Daten weisen auf eine mögliche Relevanz von NIS-aAk bei Schilddrüsenerkrankungen hin. Allerdings erscheinen, in Widerspruch zu den ersten Studien (37, 50), NIS- und PDS-aAk als primäre Marker von Erkrankungen der Schilddrüse ungeeignet und eher sinnvoll, um differentialdiagnostische Aussagen zu treffen und ggf. daraufhin die therapeutischen Maßnahmen zu stratifizieren.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Velasco I, Bath SC, Rayman MP. Iodine as Essential Nutrient during the First 1000 Days of Life. *Nutrients*. 2018;10(3).
2. Pesce L, Kopp P. Iodide transport: implications for health and disease. *Int J Pediatr Endocrinol*. 2014;2014(1):8.
3. Alotaibi H, Tuzlakoglu-Ozturk M, Tazebay UH. The Thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> Symporter: Molecular Characterization and Genomic Regulation. *Mol Imaging Radionucl Ther*. 2017;26(Suppl 1):92-101.
4. Bizhanova A, Kopp P. Minireview: The sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. *Endocrinology*. 2009;150(3):1084-90.
5. Czarnocka B. Thyroperoxidase, thyroglobulin, Na<sup>(+)</sup>/I<sup>(-)</sup> symporter, pendrin in thyroid autoimmunity. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011;16:783-802.
6. Ravera S, Reyna-Neyra A, Ferrandino G, Amzel LM, Carrasco N. The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Molecular Physiology and Preclinical and Clinical Applications. *Annu Rev Physiol*. 2017;79:261-89.
7. Rastogi MV, LaFranchi SH. Congenital hypothyroidism. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:17.
8. Heufelder AE, Joba W, Morgenthaler NG. Autoimmunity involving the human sodium/iodide symporter: fact or fiction? *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001;109(1):35-40.
9. Carvalho DP, Dupuy C. Thyroid hormone biosynthesis and release. *Molecular and cellular endocrinology*. 2017;458:6-15.
10. Levy O, Dai G, Riedel C, Ginter CS, Paul EM, Lebowitz AN, Carrasco N. Characterization of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter with an anti-COOH terminus antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(11):5568-73.
11. Gillam MP, Sidhaye AR, Lee EJ, Rutishauser J, Stephan CW, Kopp P. Functional characterization of pendrin in a polarized cell system. Evidence for pendrin-mediated apical iodide efflux. *J Biol Chem*. 2004;279(13):13004-10.
12. Kwak MJ. Clinical genetics of defects in thyroid hormone synthesis. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2018;23(4):169-75.
13. Bach JF. The hygiene hypothesis in autoimmunity: the role of pathogens and commensals. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(2):105-20.
14. Ferrari SM, Fallahi P, Antonelli A, Benvenga S. Environmental Issues in Thyroid Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:50.
15. Kim D. The Role of Vitamin D in Thyroid Diseases. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9).
16. Schomburg L. Selenium, selenoproteins and the thyroid gland: interactions in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;8(3):160-71.
17. Iyer PC, Cabanillas ME, Waguespack SG, Hu MI, Thosani S, Lavis VR, Busaidy NL, Subudhi SK, Diab A, Dadu R. Immune-Related Thyroiditis with Immune Checkpoint Inhibitors. *Thyroid*. 2018;28(10):1243-51.
18. Guaraldi F, La Selva R, Sama MT, D'Angelo V, Gori D, Fava P, Fierro MT, Savoia P, Arvat E. Characterization and implications of thyroid dysfunction induced by immune checkpoint inhibitors in real-life clinical practice: a long-term prospective study from a referral institution. *J Endocrinol Invest*. 2018;41(5):549-56.
19. Eleftheriadou AM, Mehl S, Renko K, Kasim RH, Schaefer JA, Minich WB, Schomburg L. Re-visiting autoimmunity to sodium-iodide symporter and pendrin in thyroid disease. *Eur J Endocrinol*. 2020;183(6):571-80.

20. Gonzalez-Rodriguez E, Rodriguez-Abreu D, Spanish Group for Cancer I-B. Immune Checkpoint Inhibitors: Review and Management of Endocrine Adverse Events. *Oncologist*. 2016;21(7):804-16.
21. McLeod DS, Cooper DS. The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity. *Endocrine*. 2012;42(2):252-65.
22. Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, Di Domenicantonio A, Fallahi P. Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmun Rev*. 2015;14(2):174-80.
23. Matana A, Popovic M, Boutin T, Torlak V, Brdar D, Gunjaca I, Kolcic I, Boraska Perica V, Punda A, Polasek O, Hayward C, Barbalic M, Zemunik T. Genome-wide meta-analysis identifies novel gender specific loci associated with thyroid antibodies level in Croatians. *Genomics*. 2019;111(4):737-43.
24. Qin J, Li L, Jin Q, Guo D, Liu M, Fan C, Li J, Shan Z, Teng W. Estrogen receptor beta activation stimulates the development of experimental autoimmune thyroiditis through up-regulation of Th17-type responses. *Clin Immunol*. 2018;190:41-52.
25. Wang Y, Zhao F, Rijntjes E, Wu L, Wu Q, Sui J, Liu Y, Zhang M, He M, Chen P, Hu S, Hou P, Schomburg L, Shi B. Role of Selenium Intake for Risk and Development of Hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(2):568-80.
26. Banga JP, Schott M. Autoimmune Thyroid Diseases. *Horm Metab Res*. 2018;50(12):837-9.
27. Caturegli P, De Remigis A, Rose NR. Hashimoto thyroiditis: clinical and diagnostic criteria. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4-5):391-7.
28. Schott M, Eckstein A, Willenberg HS, Nguyen TB, Morgenthaler NG, Scherbaum WA. Improved prediction of relapse of Graves' thyrotoxicosis by combined determination of TSH receptor and thyroperoxidase antibodies. *Horm Metab Res*. 2007;39(1):56-61.
29. Kahaly GJ, Diana T, Kanitz M, Frommer L, Olivo PD. Prospective Trial of Functional Thyrotropin Receptor Antibodies in Graves Disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;105(4).
30. McLachlan SM, Rapoport B. Thyrotropin-blocking autoantibodies and thyroid-stimulating autoantibodies: potential mechanisms involved in the pendulum swinging from hypothyroidism to hyperthyroidism or vice versa. *Thyroid*. 2013;23(1):14-24.
31. Volzke H, Ludemann J, Robinson DM, Spieker KW, Schwahn C, Kramer A, John U, Meng W. The prevalence of undiagnosed thyroid disorders in a previously iodine-deficient area. *Thyroid*. 2003;13(8):803-10.
32. Kotwal A, Stan M. Current and Future Treatments for Graves' Disease and Graves' Ophthalmopathy. *Horm Metab Res*. 2018;50(12):871-86.
33. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, Braverman LE. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(2):489-99.
34. Wang B, Shao X, Song R, Xu D, Zhang JA. The Emerging Role of Epigenetics in Autoimmune Thyroid Diseases. *Front Immunol*. 2017;8:396.
35. Rojas-Villarraga A, Amaya-Amaya J, Rodriguez-Rodriguez A, Mantilla RD, Anaya JM. Introducing polyautoimmunity: secondary autoimmune diseases no longer exist. *Autoimmune Dis*. 2012;2012:254319.
36. Brix TH, Hegedus L, Weetman AP, Kemp HE. Pendrin and NIS antibodies are absent in healthy individuals and are rare in autoimmune thyroid disease: evidence from a Danish twin study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014;81(3):440-4.
37. Yoshida A, Hisatome I, Taniguchi S, Shirayoshi Y, Yamamoto Y, Miake J, Ohkura T, Akama T, Igawa O, Shigemasa C, Kamijo K, Ikuyama S, Caturegli P, Suzuki K. Pendrin Is a Novel Autoantigen Recognized by Patients with Autoimmune Thyroid Diseases. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009;94(2):442-8.

38. Morris JC, Bergert ER, Bryant WP. Binding of immunoglobulin G from patients with autoimmune thyroid disease to rat sodium-iodide symporter peptides: evidence for the iodide transporter as an autoantigen. *Thyroid*. 1997;7(4):527-34.
39. Raspe E, Costagliola S, Ruf J, Mariotti S, Dumont JE, Ludgate M. Identification of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> cotransporter as a potential autoantigen in thyroid autoimmune disease. *Eur J Endocrinol*. 1995;132(4):399-405.
40. Ajjan RA, Findlay C, Metcalfe RA, Watson PF, Crisp M, Ludgate M, Weetman AP. The modulation of the human sodium iodide symporter activity by Graves' disease sera. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1998;83(4):1217-21.
41. Ajjan RA, Kemp EH, Waterman EA, Watson PF, Endo T, Onaya T, Weetman AP. Detection of binding and blocking autoantibodies to the human sodium-iodide symporter in patients with autoimmune thyroid disease. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000;85(5):2020-7.
42. Seissler J, Wagner S, Schott M, Lettmann M, Feldkamp J, Scherbaum WA, Morgenthaler MG. Low frequency of autoantibodies to the human Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter in patients with autoimmune thyroid disease. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000;85(12):4630-4.
43. Kemp EH, Sandhu HK, Watson PF, Weetman AP. Low Frequency of Pendrin Autoantibodies Detected Using a Radioligand Binding Assay in Patients With Autoimmune Thyroid Disease. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013;98(2):E309-E13.
44. Belguith-Maalej S, Hadj-Kacem H, Rebuffat SA, Mnif-Feki M, Nguyen B, Abid M, Gross R, Ayadi H, Peraldi-Roux S. Absence of anti-pendrin auto-antibodies in the sera of Tunisian patients with autoimmune thyroid diseases. *Clin Lab*. 2010;56(7-8):335-43.
45. Minich WB, Dehina N, Welsink T, Schwiebert C, Morgenthaler NG, Kohrle J, Eckstein A, Schomburg L. Autoantibodies to the IGF1 receptor in Graves' orbitopathy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(2):752-60.
46. Mehl S, Sun Q, Gorlich CL, Hackler J, Kopp JF, Renko K, Mittag J, Schwerdtle T, Schomburg L. Cross-sectional analysis of trace element status in thyroid disease. *J Trace Elem Med Biol*. 2020;58:126430.
47. Schwiebert C, Kuhnen P, Becker NP, Welsink T, Keller T, Minich WB, Wiegand S, Schomburg L. Antagonistic Autoantibodies to Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Associate with Poor Physical Strength. *Int J Mol Sci*. 2020;21(2).
48. Schuette A, Moghaddam A, Seemann P, Duda GN, Schmidmaier G, Schomburg L. Treatment with recombinant human bone morphogenetic protein 7 leads to a transient induction of neutralizing autoantibodies in a subset of patients. *BBA Clin*. 2016;6:100-7.
49. Duntas LH. Environmental factors and thyroid autoimmunity. *Annales d'endocrinologie*. 2011;72(2):108-13.
50. Endo T, Kogai T, Nakazato M, Saito T, Kaneshige M, Onaya T. Autoantibody against Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter in the sera of patients with autoimmune thyroid disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996;224(1):92-5.
51. Chin HS, Chin DK, Morgenthaler NG, Vassart G, Costagliola S. Rarity of anti- Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS) antibody with iodide uptake inhibiting activity in autoimmune thyroid diseases (AITD). *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(10):3937-40.
52. Kim D, Huang J, Billet A, Abu-Arish A, Goepp J, Matthes E, Tewfik MA, Frenkiel S, Hanrahan JW. Pendrin Mediates Bicarbonate Secretion and Enhances Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function in Airway Surface Epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2019;60(6):705-16.
53. Rozenfeld J, Tal O, Kladnitsky O, Adler L, Efrati E, Carrithers SL, Alper SL, Zelikovic I. Pendrin, a novel transcriptional target of the uroguanylin system. *Cell Physiol Biochem*. 2013;32(7):221-37.

54. Karatas A, Erdem H, Karatas Z, Ozlu T, Cakmak B. The effect of smoking on placental pendrin expression. *J Obstet Gynaecol.* 2017;37(1):11-4.
55. Seshadri S, Lu X, Purkey MR, Homma T, Choi AW, Carter R, Suh L, Norton J, Harris KE, Conley DB, Kato A, Avila PC, Czarnocka B, Kopp PA, Peters AT, Grammer LC, Chandra RK, Tan BK, Liu Z, Kern RC, Schleimer RP. Increased expression of the epithelial anion transporter pendrin/SLC26A4 in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(6):1548-58 e7.
56. Muller I, Zhang L, Giani C, Dayan CM, Ludgate ME, Grennan-Jones F. The sodium iodide symporter is unlikely to be a thyroid/breast shared antigen. *J Endocrinol Invest.* 2016;39(3):323-31.
57. Medici M, Porcu E, Pistis G, Teumer A, Brown SJ, Jensen RA, Rawal R, Roef GL, Plantinga TS, Vermeulen SH, Lahti J, Simmonds MJ, Husemoen LL, Freathy RM, Shields BM, Pietzner D, Nagy R, Broer L, Chaker L, Korevaar TI, Plija MG, Sala C, Volker U, Richards JB, Sweep FC, Gieger C, Corre T, Kajantie E, Thuesen B, Taes YE, Visser WE, Hattersley AT, Kratzsch J, Hamilton A, Li W, Homuth G, Lobina M, Mariotti S, Soranzo N, Cocca M, Nauck M, Spielhagen C, Ross A, Arnold A, van de Bunt M, Liyanarachchi S, Heier M, Grabe HJ, Masciullo C, Galesloot TE, Lim EM, Reischl E, Leedman PJ, Lai S, Delitala A, Bremner AP, Philips DI, Beilby JP, Mulas A, Vocale M, Abecasis G, Forsen T, James A, Widen E, Hui J, Prokisch H, Rietzschel EE, Palotie A, Feddema P, Fletcher SJ, Schramm K, Rotter JI, Kluttig A, Radke D, Traglia M, Surdulescu GL, He H, Franklyn JA, Tiller D, Vaidya B, de Meyer T, Jorgensen T, Eriksson JG, O'Leary PC, Wichmann E, Hermus AR, Psaty BM, Ittermann T, Hofman A, Bosi E, Schlessinger D, Wallaschofski H, Pirastu N, Aulchenko YS, de la Chapelle A, Netea-Maier RT, Gough SC, Meyer Zu Schwabedissen H, Frayling TM, Kaufman JM, Linneberg A, Raikonen K, Smit JW, Kiemeny LA, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, Walsh JP, Meisinger C, den Heijer M, Visser TJ, Spector TD, Wilson SG, Volzke H, Cappola A, Toniolo D, Sanna S, Naitza S, Peeters RP. Identification of novel genetic Loci associated with thyroid peroxidase antibodies and clinical thyroid disease. *PLoS Genet.* 2014;10(2):e1004123.
58. Portulano C, Paroder-Belenitsky M, Carrasco N. The Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS): mechanism and medical impact. *Endocr Rev.* 2014;35(1):106-49.
59. Shen DH, Kloos RT, Mazzaferri EL, Jhian SM. Sodium iodide symporter in health and disease. *Thyroid.* 2001;11(5):415-25.

## 6. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Anna-Maria Eleftheriadou, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: NIS- und Pendrin-Autoantikörper als diagnostische Marker von Schilddrüsenerkrankungen/ NIS- and pendrin-autoantibodies as diagnostic markers in thyroid disease selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift (Anna-Maria Eleftheriadou)

## 7. Publikation

**Anna-Maria Eleftheriadou**, Sebastian Mehl, Kostja Renko, Rega H. Kasim, Jasmin-Annabelle Schaefer, Waldemar B. Minich, Lutz Schomburg.

*Re-visiting autoimmunity to sodium-iodide symporter and pendrin in thyroid disease.*

Eur J Endocrinol. 2020 Dec;183(6):571-580. doi: 10.1530/EJE-20-0566.

URL: <https://doi.org/10.1530/eje-20-0566>

URL: <https://doi.org/10.1530/eje-20-0566>



URL: <https://doi.org/10.1530/eje-20-0566>

URL: <https://doi.org/10.1530/eje-20-0566>

URL: <https://doi.org/10.1530/eje-20-0566>

URL: <https://doi.org/10.1530/eje-20-0566>

URL: <https://doi.org/10.1530/eje-20-0566>

URL: <https://doi.org/10.1530/eje-20-0566>

URL: <https://doi.org/10.1530/eje-20-0566>

URL: <https://doi.org/10.1530/eje-20-0566>



URL: <https://doi.org/10.1530/eje-20-0566>

## **8. Lebenslauf**

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

## 9. Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Lutz Schomburg für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen, für die exzellente Betreuung und Unterstützung im Rahmen meiner wissenschaftlichen Forschung. Prof. Dr. Schomburg hat sich immer Zeit genommen und mich auf dem ganzen Weg angeleitet und unterstützt. Durch Prof. Dr. Lutz Schomburg habe ich einen Einblick in die wissenschaftliche Forschung gewonnen und ein spannendes Betätigungsfeld hat sich für mich eröffnet. Ich bedanke mich für die ausnahmslose wissenschaftliche Unterstützung. Ich hätte mir keine bessere Betreuung wünschen können.

Außerdem bedanke ich mich herzlich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Experimentelle Endokrinologie, namentlich: Waldemar B. Minich, Kostja Renko, Rega H. Kasim und Jasmin-Annabelle Schaefer für die tatkräftige Unterstützung beim Erheben der Daten.

Ein ganz besonderer Dank gilt Gabriele Boehm und Julian Hackler für ihre Mühe und Zeit mir in Experimenten und statistischer Analyse der Ergebnisse zu helfen. Sie waren immer offen für Diskussionen und Ideenaustausch.

Danken möchte ich auch meinen Bruder, der stets am Voranschreiten meiner Arbeit interessiert war und durch konstruktive Kritik und Tipps in der Verfassung meiner Arbeit beigetragen hat.

Von Herzen danke ich meinen Eltern für die stetige emotionale Unterstützung während des Studiums, ohne die die Promotionsarbeit nicht möglich gewesen wäre.