

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

DISSERTATION

Detection and Physiological Role of Autoimmunity against
Thyroid Hormone Transporters

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Theresa Porst
aus Heidelberg

Datum der Promotion: 26.06.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract.....	3
2. Abstrakt.....	4
3. Manteltext	5
3.1. Einleitung.....	5
3.1.1. Schilddrüsenhormone und Autoimmunität	5
3.1.2. Schilddrüsenhormontransporter.....	6
3.1.3. Fragestellung: MCT8 und MCT10 als Autoantigene im Menschen?.....	7
3.2 Material und Methoden.....	8
3.2.1. Konstruktion der MCT8- und MCT10-Luciferasefusionsproteine	8
3.2.2. Herstellung des MCT8- und MCT10-Zellextrakts.....	8
3.2.3. Kommerzielle Antikörper.....	9
3.2.4. Proband*innen	9
3.2.5. Messung von MCT8- und MCT10-Autoantikörpern.....	10
3.2.6. Quantifizierung von MCT8- und MCT10-Autoantikörpern	10
3.2.7. Statistische Analysen.....	11
3.2.8. Charakterisierung der MCT8-aAk mit Immunpräzipitation	11
3.2.9. Effekt von MCT8-aAk auf die Schilddrüsenhormonaufnahme.....	12
3.3. Ergebnisse	13
3.3.1. Assay-Etablierung und Testung mittels kommerzieller Antikörper	13
3.3.2. Prävalenz von MCT8-aAk und MCT10-aAk bei gesunden Proband*innen	14
3.3.3. Prävalenz von MCT8-aAk und MCT10-aAk bei Schilddrüsenpatient*innen.....	15
3.3.4. Prävalenz von MCT8-aAk und MCT10-aAk bei übergewichtigen Jugendlichen	16
3.3.5. In-vitro-Aktivität von MCT8-aAk beeinflusst die Schilddrüsenhormonaufnahme	17
3.4. Diskussion	19
3.5. Bibliografie.....	24
4. Eidesstattliche Versicherung.....	28
5. Anteilserklärung an der erfolgten Publikation.....	29
6. Auszug aus der Journal Summary List.....	30
7. Publikation	32
8. Lebenslauf	44
9. Publikationsliste	44
10. Patent.....	46
11. Danksagung.....	47

1. Abstract

The monocarboxylate transporters 8 (MCT8) and 10 (MCT10) are important molecules enabling thyroid hormone (TH) uptake and intracellular signaling via nuclear TH receptors. Hypothyroidism, i.e., reduced TH activity, is generally associated with impaired development, in association with weight gain and increasing discomfort. We hypothesized that the transporters may serve as autoantigens in humans, and that autoantibodies (aAb) to MCT8 or MCT10 can be found in serum from adolescents and adult subjects. Two quantitative tests for MCT8-aAb and MCT10-aAb were developed and characterized with commercial antiserum. Serum samples from healthy controls, thyroid patients and young overweight subjects were analyzed for MCT8-aAb and MCT10-aAb, and prevalence of the aAb was compared. Cell culture experiments were conducted to assess a potential biological activity of MCT8-aAb on TH uptake in vitro. The clinical studies indicated that MCT8-aAb and MCT10-aAb are present in a subset of subjects. MCT8-aAb were most prevalent in thyroid patients as compared to healthy controls and overweight adolescents. The cell culture experiments indicated that MCT8-aAb from human serum is capable of interfering with regular T4 uptake, as compared to control serum. Similar to MCT8-aAb, the prevalence of MCT10-aAb was highest in the group of thyroid patients. It can be concluded that both transporters represent autoantigens in humans, and that MCT8-aAb are capable of suppressing TH signaling. The relatively high prevalence of MCT8-aAb and MCT10-aAb in thyroid disease deserves further analyses, as their detection may be of diagnostic value and pathophysiological relevance. This hypothesis deserves an in-depth analysis of both MCT8-aAb and MCT10-aAb in a larger prospective study.

2. Abstrakt

Kontext: Die Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) und 10 (MCT10) spielen eine wichtige Rolle bei der Schilddrüsenhormonaufnahme sowie bei der Hormonsignalübertragung. Reduzierte Schilddrüsenhormonaktivität ist mit beeinträchtigter Entwicklung, Gewichtszunahme und Unwohlsein assoziiert.

Hypothese: Autoantikörper (aAk) gegen MCT8 oder MCT10 sind bei Patient*innen mit Schilddrüsenerkrankungen sowie Adipositas prävalent.

Material und Methoden: Analytische Tests für MCT8- und MCT10-Autoantikörper wurden entwickelt und mit kommerziellen Immunsereen charakterisiert. Serumproben einer gesunden Kohorte Erwachsener, Patient*innen mit Schilddrüsenerkrankungen und junger übergewichtiger Proband*innen wurden analysiert und die Prävalenz der aAk wurde verglichen. Zudem wurden die biologischen Effekte von MCT8-aAk auf die Schilddrüsenhormonaufnahme in Zellkultur getestet.

Ergebnisse: MCT8-aAk und MCT10-aAk wurden bei gesunden Erwachsenen, Patient*innen mit Schilddrüsenerkrankungen und junger übergewichtiger Proband*innen detektiert. MCT8-aAk zeigten die höchste Prävalenz in der Gruppe der Schilddrüsenpatient*innen (11,9 %) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (3,8 %) und zu den übergewichtigen Jugendlichen (4,2 %). Positiv auf MCT8-aAK getestete Seren reduzierten die T4-Aufnahme in Zellkultur, wohingegen MCT8-aAk-negative Seren keinen Einfluss auf die Aufnahme hatten. Die Prävalenz der MCT10-aAk-positiven Proben war am höchsten in der Gruppe der Schilddrüsenpatient*innen im Vergleich mit gesunden Erwachsenen bzw. übergewichtigen Jugendlichen (9,0 % gegenüber 4,5 % bzw. 6,3 %).

Schlussfolgerung: MCT8 und MCT10 fungieren als Autoantigene im Menschen und stören möglicherweise den normalen Schilddrüsenhormonsignalweg. Die erhöhten Prävalenzen von MCT8-aAk und MCT10-aAk bei Schilddrüsenerkrankungen weisen auf ihre mögliche pathophysiologische Relevanz hin. Diese Hypothese sollte in großen prospektiven Studien analysiert werden.

3. Manteltext

3.1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit aus dem Institut für Experimentelle Endokrinologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin beschäftigt sich mit Autoimmunität gegen die Schilddrüsenhormontransporter MCT8 und MCT10. Am Institut für Experimentelle Endokrinologie wird Grundlagenforschung der Endokrinologie betrieben; die translationalen Anwendungen dieser neu gewonnenen Erkenntnisse in Klinik und Patient*innenversorgung stehen im Fokus. Wichtige Themenschwerpunkte sind autoimmune Schilddrüsenerkrankungen wie Morbus Basedow und Hashimoto Thyreoiditis, sowie die Erforschung und Erprobung neuer diagnostischer Verfahren.

3.1.1. Schilddrüsenhormone und Autoimmunität

Schilddrüsenhormone (SH) sind auf Zellkernebene für die Aktivierung komplexer Signalwege verantwortlich und steuern so die Homöostase des gesamten Organismus ¹. Während einer regelrechten kindlichen Entwicklung sind SH primär für das Wachstum aller Organe und Gewebe verantwortlich. Im Erwachsenenalter steuern SH den Energiestoffwechsel und sind somit nicht nur überlebenswichtig, sondern auch für das individuelle gesundheitliche Wohlbefinden verantwortlich. Aufgrund dieser zentralen Steuerfunktion der Schilddrüse stellen sowohl eine Überfunktion wie auch eine Unterfunktion wichtige internistische Krankheitsbilder dar, die mit variablen und weitreichenden Symptomen einhergehen ². Ein möglicher Auslöser bzw. gute diagnostische Marker dieser Krankheiten sind im Blut zirkulierende Autoantikörper (aAk), die die SH-Achse stören und den Hormonstatus ins Ungleichgewicht bringen können.

Autoantikörper gegen das SH-Syntheseprotein Thyreoperoxidase (TPO) sind typischerweise bei einer Hashimoto Thyreoiditis nachweisbar, während bei Morbus Basedow aAk gegen den Rezeptor des Thyreoidea-stimulierenden Hormons (TSH), also den TSH-Rezeptor ein gängiges Diagnosekriterium sind ². Gegen den TSH-Rezeptor konnten neutrale, blockierende sowie stimulierende aAk nachgewiesen und charakterisiert werden ^{3,4}. Dieses Beispiel zeigt, dass das fehlgeleitete Immunsystem sogar in der Lage ist, mit dem TSH-Rezeptor eine zentrale Komponente der Schilddrüsenhormonachse anzugreifen ^{5,6}. Warum es bei manchen Menschen zum Verlust der immunologischen

Selbsttoleranz kommt ist noch nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen zu dessen Entwicklung genetische Anfälligkeit sowie Wechselwirkungen zwischen endogenen Ursachen und Umweltfaktoren beitragen ⁷.

3.1.2. Schilddrüsenhormontransporter

Die im Blutkreislauf zirkulierenden Schilddrüsenhormone Triiodthyronin (T3) und Tetraiodthyronin (T4) sind aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften zu 99 % an die Eiweißproteine Thyroxin-bindendes Globulin, Albumin und Transthyretin gebunden. Um ihre Stoffwechsel-regulierenden Funktionen an nukleären Rezeptoren ausüben zu können, müssen die negativ geladenen SH die Plasmamembran ihrer Zielzellen überwinden ⁸. Passives Diffundieren durch die hydrophoben Zellmembranabschnitte ist hingegen früherer Annahmen für diese geladenen Aminosäurederivate unmöglich, sodass Transmembranproteine vorhanden sein müssen, die SH entweder passiv passieren lassen oder diese aktiv in die Zelle hinein transportieren ⁹.

Aus der großen Gruppe potentieller SH-Transporter, die sich in Expressionsmuster, Struktur, Regulierung ihrer Biosynthese, Transportpräferenzen und Aktivität unterscheiden, sind die Monocarboxylat-Transporter von besonderem Interesse ¹⁰. Ein Mitglied ihrer Gruppe, MCT8 (solute carrier family 16, member 2, SCL16A2), wurde als erster Schilddrüsenhormontransporter als Ursache für eine menschliche Erbkrankheit identifiziert: das Allan-Herndon-Dudley-Syndrom (AHDS) ^{11, 12}. Bei dieser seltenen Krankheit handelt es sich um eine X-chromosomal-rezessive Entwicklungsstörung. Mutationen in dem für MCT8 codierenden Gen SLC16A2 verhindern den Transport von SH in neuronale Zielzellen, sodass der SH-Signalweg gestört wird. Die daraus resultierende schwere Entwicklungsstörung verhindert eine normale muskuläre, neuronale und intellektuelle Entwicklung. Die betroffenen Kinder zeigen bereits kurz nach der Geburt eine schwere Muskelhypotonie und können im Laufe der Zeit eine Spastik sowie generalisierte Muskelschwäche entwickeln ¹³. Der meist sehr ausgeprägte Phänotyp resultiert wahrscheinlich aus einer schweren zerebralen Hypothyreose in Kombination mit peripher stark erhöhten T3-Werten und damit einer peripheren Thyreotoxikose ¹⁴. Momentan werden verschiedene therapeutische Ansätze ¹⁵ diskutiert und erste klinische Studien werden sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen durchgeführt, die von AHDS

betroffen sind ¹⁶. Ein möglicher Weg könnte die pränatale Therapie des Fötus über die schwangere Mutter sein ¹⁷.

MCT10 (codiert im Gen SCL16A10) ist ein zweiter Schilddrüsenhormontransporter, der dem MCT8 in Struktur, Sequenz und Transportcharakteristika ähnelt ¹⁸. Bis dato wurden noch keine genetischen Defekte für MCT10 gefunden.

3.1.3. Fragestellung: MCT8 und MCT10 als Autoantigene im Menschen?

MCT8 wurde als essentieller Plasmamembrantransporter für die zentrale und periphere Schilddrüsenhormonaufnahme sowie -abgabe charakterisiert. Da MCT8 zudem der Zirkulation über den Blutkreislauf ausgesetzt ist, entschieden wir zu testen, ob MCT8 ein Autoantigen im Menschen darstellt. Hierzu entwickelten und etablierten wir einen neuartigen, quantitativen Autoantikörpertest gegen MCT8 und parallel dazu gegen das nah verwandte MCT10. Wir untersuchten die Prävalenzen von MCT8-aAk und MCT10-aAk in drei Proband*innengruppen: Gesunde Erwachsene, übergewichtige Jugendliche und Schilddrüsenpatient*innen (M. Basedow, Hashimoto Thyreoiditis und andere). Der Grundgedanke in der Auswahl dieser Proband*innengruppen liegt in der Hypothese, dass MCT8- oder MCT10-hemmende aAk die Schilddrüsenfunktion, den Schilddrüsenhormongehalt und die Energieregulation verändern könnten. Es konnten tatsächlich positive Proband*innen für MCT8-aAk und MCT10-aAk identifiziert werden. Zudem wurde eine erhöhte Prävalenz von Autoantikörpern gegen MCT8 und MCT10 in der Gruppe der Schilddrüsenerkrankungen beobachtet.

3.2 Material und Methoden

3.2.1. Konstruktion der MCT8- und MCT10-Luciferasefusionsproteine

Die offenen Leseraster, welche für menschliches MCT8 bzw. MCT10 codieren, wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt und mit einem Firefly Luciferase Gen (Luc) fusioniert, wie in der Literatur beschrieben¹⁹⁻²¹. Die beim Glühwürmchen für die Biolumineszenz verantwortliche Firefly Luciferase wird in der Biotechnologie häufig als Reporter gen eingesetzt. Das nach Fusionierung entstandene kombinierte Leseraster aus MCT8 und Luc bzw. MCT10 und Luc wurde in den Expressionsvektor pIRESneo eingesetzt. Somit entstanden der pIRESneo-MCT8-Luc-Expressionsvektor sowie der pIRESneo-MCT10-Luc-Expressionsvektor. Die entstandenen Sequenzen wurden mittels DNA-Sequenzierung durch einen gewerblichen Dienstleister (LGC Genomics GmbH, Berlin, Deutschland) verifiziert. Diese beiden zusammengesetzten Expressionsvektoren wurden in Human Embryonic Kidney Zellen (HEK-293) eingebracht (Transfektion). Stabile Zellklone, die hohe Anzahlen der rekombinanten MCT8-Luc- bzw. MCT10-Luc-Fusionsproteine exprimieren, wurden mit appliziertem Selektionsdruck durch das Antibiotikum Genetecin (G418) etabliert. Der pIRESneo-Expressionsvektor enthält das Resistenzgen „neo“ gegen dieses Aminoglykosid-Antibiotikum, sodass nach Applikation von G418 alle Zellen sterben, die den Expressionsvektor nicht korrekt in ihre Sequenz eingebaut haben. Somit hat bei den daraufhin wachsenden, stabil transfizierten Zellen ein dauerhafter Einbau des Fusionsproteins in das Genom stattgefunden.

3.2.2. Herstellung des MCT8- und MCT10-Zellextrakts

Die stabil transfizierten Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), einem standardisierten Nährmedium für Zellkultur, vermehrt, welches mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS) supplementiert wurde. Die Zellen wurden in 75 mm² großen Platten gezüchtet, täglich mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen sowie regelmäßigen Nährmediumwechseln unterzogen. Das Zellwachstum sowie die Integrität der Zellen wurde lichtmikroskopisch bis zum Erreichen der Konfluenz beurteilt. Das Abarnten der konfluierenden Zellen erfolgte in PBS, anschließend wurden die Zellen in Resuspensionspuffer lysiert (20 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 % Triton X-100 und 10 % Glycerol). Diese Suspension wurde zentrifugiert (2000 g, 5 min, 4 °C) und

damit aufgereinigt. Der Überstand wurde gesammelt, in Aliquots bei -80 °C gelagert und zu den Messungen aufgetaut. Ausreichende Mengen der jeweiligen Fusionsproteine, welche für die Analysen gebraucht wurden, konnten produziert werden.

3.2.3. Kommerzielle Antikörper

Um die Eignung für klinische Analysen sowie die Leistungsfähigkeit der neu entwickelten aAk-Assays zu testen und um das Detektionslimit zu überprüfen, wurden kommerzielle Immunsereen erworben. Diese Immunsereen wurden mit humanem Serum verdünnt, um die präferierte analytische Matrix herzustellen. Es wurde jeweils ein Immunsereum gegen humanes MCT8 erworben (novus biologicals, Europe Office, Bio-Techne GmbH, Wiesbaden, Deutschland, cat. no. NBP2-57308, lot #A117467) sowie eines gegen humanes MCT10 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland, prestige antibodies, cat. no. HPA016860, lot #B106546).

3.2.4. Proband*innen

Die Prävalenz von MCT8-aAk und MCT10-aAk in der allgemeinen Bevölkerung wurde in einer Kohorte gesunder Erwachsener (n = 200 männliche und n = 200 weibliche Proband*innen) analysiert. Ein gewerblicher Anbieter (in.vent Diagnostik GmbH, Hennigsdorf, Deutschland) verkauft diese Serumproben nach Pseudonymisierung und schriftlicher Einverständniserklärung aller Personen. Eine ethische Freigabe für diese Proben wurde von der Firma eingeholt, ehe diese Proben in den Verkauf kamen und uns zur Verfügung gestellt wurden.

An der MAINTAIN Studie nahmen übergewichtige Jugendliche teil und unterzogen sich einer Intervention zur Körpergewichtsreduktion und -erhaltung. An dieser Studie wurde eine potentielle Relevanz von MCT8-aAk und MCT10-aAk für den Stoffwechsel und die Gewichtskontrolle getestet. Die Abteilung für pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, sammelte die Serumproben²². Die Studie wurde bei ClinicalTrials (NCT00850629) registriert; eine schriftliche Einverständniserklärung wurde vor Studieneinschluss von den Patient*innen und von mindestens einem Elternteil eingeholt.

Eine Querschnittsstudie erwachsener Schilddrüsenpatient*innen (n = 318) wurde vermessen, um eine mögliche Verbindung zwischen MCT8-aAk oder MCT10-aAk und Schilddrüsenerkrankungen zu evaluieren. Die Studie wurde in einer ambulanten Praxis in Berlin durchgeführt; die Patient*innen wurden unabhängig ihrer Schilddrüsenerkrankungs-entität und laufender Therapien fortlaufend eingeschlossen. Alle Patient*innen willigten vor Einschluss schriftlich ein²³. Sämtliche Analysen der Proben wurden in einem unabhängigen Labor und in Bezug auf klinische Charakteristika verblindet durchgeführt. Die beiden klinischen Studien wurden durch die Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin zugelassen (#EA2/015/09 und #EA2/173/17) und in Einhaltung der Leitlinien der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

3.2.5. Messung von MCT8- und MCT10-Autoantikörpern

Aliquots der vorbereiteten Fusionsproteine (40 µl pro Reaktion) wurden mit 10 µl Serum über Nacht bei 4 °C inkubiert. Immunkomplexe bildeten sich zwischen den Fusionsproteinen und den endogenen Immunglobulinen aus und wurden anschließend mit einer Protein A Sepharose Zubereitung (POROS-A, 10 % (vol/vol), ASKA Biotech GmbH, Berlin) bei Raumtemperatur für 1,5 Stunden inkubiert. Die Komplexe wurden zentrifugiert (500 g, 5 min, 4 °C) und damit ausgefällt. Die dabei am Boden entstandenen Pellets wurden drei Mal mit Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,5 % Triton X-100) gewaschen. Danach wurden die Luciferase-Aktivitäten nach Zugabe des Substrats Luciferin in einem Luminometer (Mitras, Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, Deutschland) gemessen. Die Ergebnisse wurden in relativen Lichteinheiten (RLU) verzeichnet.

3.2.6. Quantifizierung von MCT8- und MCT10-Autoantikörpern

Aus den gemessenen RLU wurden Bindungsindizes (BI) berechnet: Die untere Hälfte aller Signale wurde auf 1 normiert und das probenspezifische Signal wurde dazu ins Verhältnis gesetzt. Das mathematische Ausreißerkriterium wurde angewendet, um zu entscheiden wann ein gegebenes Signal als positiv zu bewerten ist. Dafür wurden die vollen Signalsätze verwendet und jeweils die 75. Perzentile (P75) ermittelt. Durch Addition des 1,5-fachen Interquartilsabstands (IQR) ergibt sich $P75 + 1,5 \cdot IQR$ als Schwellenwert. Diese Analysen wurden für alle drei Kohorten separat durchgeführt, da jede Kohorte einzeln und

zu verschiedenen Zeitpunkten vermessen wurde. Daraus ergaben sich leicht unterschiedliche Signalstärken der Hintergrundlevel.

3.2.7. Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mit den Programmen GraphPad Prism v4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) und mit SAS Version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA) durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung bzw. Median mit dem Interquartilsabstand (IQR), wie jeweils angegeben, dargestellt. Mittels des Shapiro-Wilk-Tests wurde überprüft, ob die Messwerte der jeweiligen Kohorten normalverteilt waren. Falls Normalverteilung angenommen werden konnte, wurde der abhängige T-Test durchgeführt, um quantitative Merkmale zu vergleichen.

Ansonsten wurden die Daten mit dem zweiseitigen nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test verglichen. Statistische Signifikanz wurde als * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ oder *** $P < 0,001$ angegeben.

3.2.8. Charakterisierung der MCT8-aAk mit Immunpräzipitation

Hämagglutinin-(HA)-markierte MCT8-exprimierende Madine-Darby Canine Kidney (MDCK-1) Zellen wurden generiert²⁴ und Proteinextrakt wurde wie oben beschrieben hergestellt. MCT8-HA enthaltendes Zellextrakt (100 μ l pro Reaktion) wurde mit 50 μ l Serum und 15 μ l Proteaseinhibitor-Cocktail (cOmplete, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) über Nacht bei 4 °C und konstantem Schütteln inkubiert. Die Proben wurden mit 100 μ l Protein-A-Suspension für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert; die so geformten Immunkomplexe wurden zentrifugiert (500 g) und somit pelletiert. Das ausgefällte Material wurde sechs Mal mit PBS gewaschen und in Dithiothreitol-(DTT)-enthaltendem Probenpuffer resuspendiert. Die Komplexe wurden durch Inkubation bei 95 °C für 5 Minuten aufgelöst und anschließend für 15 Minuten zentrifugiert (10 000 g). Die somit herausgelösten Proteine wurden mittels einer Elektrophorese in 10 % SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese) aufgetrennt und auf Zellulosenitratmembranen transferiert. Die Membranen wurden über Nacht bei 4 °C einem anti-HA-Antikörper (ab9110, abcam, Cambridge, GB) in Milch und Inkubationspuffer ausgesetzt. Die Membranen wurden drei Mal mit PBS-T (Phosphatgepufferte Lösung mit Tween) gewaschen und mit einem Meerrettichperoxidase-(HRP)-gekoppelten anti-Hase-

Antikörper und Milch für eine Stunde inkubiert und noch drei Mal mit PBS-T für jeweils 10 Minuten gewaschen. Die hierdurch entstandenen Banden wurden mit einem durch Chemolumineszenz verstärkten Western blot-Detektionskit visualisiert.

3.2.9. Effekt von MCT8-aAk auf die Schilddrüsenhormonaufnahme

Um die biologische Aktivität von natürlichen MCT8-aAk zu testen, wurden positive Proben sowie Kontrollproben (jeweils 300 µl) mit 300 µl PBS verdünnt und über Nacht unter konstanter Bewegung bei 4 °C mit 300 µl einer Protein-A-Sepharose-Suspension inkubiert. Die formierten Komplexe wurden pelletiert und sechs Mal mit PBS gewaschen. Gebundene Immunglobuline wurden mit 25 mM (mmol/Liter) Salzsäure (pH 3,0) herausgelöst, und der pH-Wert wurde sofort mithilfe von HEPES-NaOH (1M, pH 8,0) auf 7,0 eingestellt. Diese Immunglobuline wurden mithilfe von Centricon-Filtern bei 4 °C auf 300 µl konzentriert (finale Proteinkonzentration 10 mg/ml). Störende Effekte der isolierten Immunglobuline auf die Schilddrüsenhormonaufnahme wurden mit MDCK-1 Zellen, die rekombinantes MCT8-HA exprimieren, getestet. Die Zellen wurden dazu mit radioaktiv markiertem SH ¹²⁵I-T4 (PerkinElmer Life Sciences) inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert, wie in der Literatur beschrieben ²⁴.

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Assay-Etablierung und Testung mittels kommerzieller Antikörper

Die beiden neu generierten Assays für MCT8-aAk und MCT10-aAk wurden ausgedehnten Tests unterzogen, deren Ergebnisse hier nicht im Einzelnen dargestellt sind. Diese Tests dienten dazu, die spezifischen Charakteristika der Assays zu ergründen und etablierten das oben angegebene, ideale Messprotokoll. Exemplarisch ist hier der Test auf Linearität der Signale beschrieben: Ein kommerziell verfügbares MCT8-spezifisches sowie ein MCT10-spezifisches Immuneserum wurden ausgewählt, die Antikörper gegen humanes MCT8 bzw. MCT10 enthalten. Die Immuneseren wurden mit humanem Serum als Matrix vermischt und in einer Verdünnungsreihe gemessen. Diese spezifischen Antikörper sind in der Lage an das MCT8-Luc-Fusions-Protein (Abb. 1A) bzw. an das MCT10-Luc-Fusion-Protein (Abb. 1B) zu binden und den Nachweiskomplex durch die durch Protein A vermittelte Ausfällung auszulösen. Die gemessenen Signale wurden umso stärker reduziert je mehr sie verdünnt wurden. Daraus ergab sich eine annähernd lineare Korrelation über jeweils eine Größenordnung. Somit ergibt sich eine akzeptable Dynamik für die beabsichtigten klinischen Analysen.

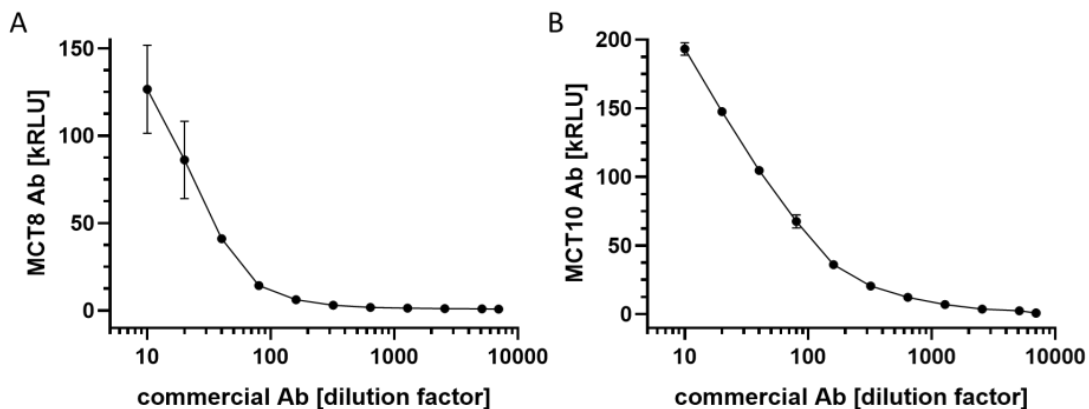


Abb. 1: Charakterisierung des neuen Assays mit jeweils einem kommerziellen anti-MCT8- bzw. anti-MCT10-Immuneserum.

- A) Verdünnung des kommerziellen MCT8-aAk mit humanem Serum ergab dosisabhängige Signale, dies deutet auf ein geeignetes Assay-Design und einen akzeptablen Messbereich für klinische Proben hin.
- B) Das kommerzielle Antiserum zu humanem MCT10 war ebenfalls geeignet, den neu entwickelten Assay für die Erkennung und Quantifizierung von MCT10-aAk in klinischen Proben zu überprüfen.

Die Messungen wurden als Duplikate erstellt, kRLU: 1000 relative light units. Diese Abbildung entspricht unseren Ergebnissen der 2021 publizierten Studie ⁵⁵.

3.3.2. Prävalenz von MCT8-aAk und MCT10-aAk bei gesunden Proband*innen

Serumproben einer Querschnittsstudie gesunder menschlicher Proband*innen (n = 400, 50 % weiblich) wurden parallel mit beiden Assays analysiert. Die erhaltenen Signale zeigten eine nicht-normalverteilte Verteilung und wiesen damit auf das Vorhandensein von spezifischen aAk hin. Wenige schwach positive Proben wurden mit dem MCT8-aAk-Assay identifiziert (Abb. 2A) und einige hoch positive wurden mit dem MCT10-aAk-Assay gefunden (Abb. 2B). Wendet man das Ausreißerkriterium der 75. Perzentile plus 1,5 mal den Interquartilsabstand ($P75+1,5 \cdot IQR$) an, definiert ein Bindungsindex von 2,01 den Schwellenwert für Positivität. Die Prävalenz bei gesunden Erwachsenen betrug somit für MCT8-aAk 3,8 % (15 von 400, 8 Frauen, 7 Männer) und 4,5 % für MCT10-aAk (18 von 400, 8 Frauen, 10 Männer). Die Stärke der Signale für MCT10-aAk hat die für MCT8-aAk stark übertroffen.

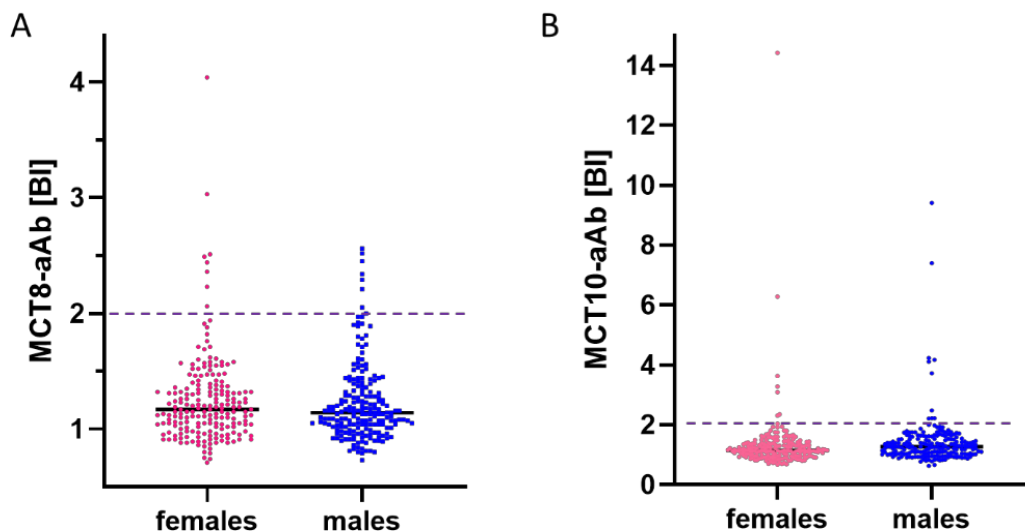


Abb. 2: Prävalenz von MCT8-aAk und MCT10-aAk in einer gesunden Kontrollgruppe
In den parallel gemessenen Assays konnte kein geschlechtstypischer Unterschied festgestellt werden.

A) Für MCT8-aAk ergab sich eine Prävalenz von 3,8 %.

B) Für MCT10-aAk ergab sich eine Prävalenz von 4,5 %.

Der Bindungsindex (y-Achse, Faktor über Hintergrund) und der Schwellenwert für Positivität ($P75+1,5 \cdot IQR$ aller Signale, gestrichelte Linie) sind angegeben. Diese Abbildung entspricht unseren Ergebnissen der 2021 publizierte Studie ⁵⁵.

3.3.3. Prävalenz von MCT8-aAk und MCT10-aAk bei Schilddrüsenpatient*innen

Die Prävalenz von MCT8-aAk und MCT10-aAk wurde in einer Kohorte erwachsener Schilddrüsenpatient*innen bestimmt. Die Signalverteilung war nicht-normalverteilt (Abb. 3). Positive Serumproben für MCT8-aAk wurden mit einer Prävalenz von 11,9 % (38 von 318) und für MCT10-aAk mit einer Prävalenz von 6,3 % (20 von 317) bei Schilddrüsenpatient*innen gefunden (Abb. 3A). Teilt man die gesamte Studiengruppe auf die verschiedenen Krankheiten auf, ist die Prävalenz von hoch-positiven MCT8-aAk-Proben in den Gruppen M. Basedow (n = 11), Hashimoto Thyreoiditis (n = 12) und den anderen Schilddrüsenerkrankungen (n = 15) ähnlich (Abb. 3B). Analog dazu gab es keinen augenscheinlichen Unterschied bezüglich MCT10-aAk: M. Basedow (n = 6), Hashimoto Thyreoiditis (n = 6) und andere Schilddrüsenerkrankungen (n = 8) (Abb. 3B).

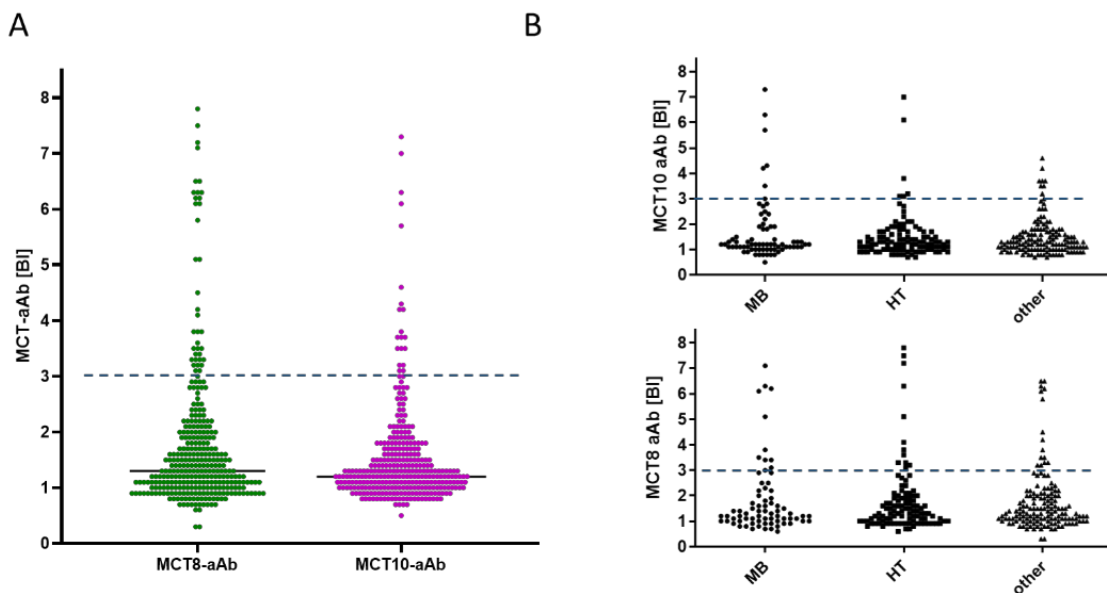


Abb. 3: Prävalenz von MCT8-aAk und MCT10-aAk bei Schilddrüsenpatient*innen

- A) Eine Kohorte erwachsener Schilddrüsenpatient*innen mit verschiedenen Schilddrüsenerkrankungen wurde im MCT8-aAk- bzw. im MCT10-aAk-Assay analysiert. Einige hoch-positive Serumproben, die den diagnostischen Schwellenwert überschritten haben, wurden identifiziert.
- B) Die Patient*innen wurden nach ihrer Hauptdiagnose in drei Gruppen eingeteilt: M. Basedow (MB), Hashimoto Thyreoiditis (HT) und andere Erkrankungsentitäten (other). In allen Erkrankungsgruppen wurden positive Proben gefunden, es zeigte sich also kein krankheitsspezifisches Muster bezüglich MCT8-aAk bzw. MCT10-aAk.

Der Bindungsindex (BI) ist neben dem Schwellenwert ($P75+1,5 \cdot IQR$) für positive Proben (gestrichelte Linie) angegeben. Diese Abbildung entspricht unseren Ergebnissen der 2021 publizierten Studie ⁵⁵.

3.3.4. Prävalenz von MCT8-aAk und MCT10-aAk bei übergewichtigen Jugendlichen

Eine Kohorte gesunder übergewichtiger Jugendlicher ($n = 143$), die an einem Gewichtsreduktionsprogramm („Maintain“) teilnahmen, wurde vermessen. Die gemessenen Signale für MCT8-aAk und MCT10-aAk zeigten wie zuvor beobachtet nicht-normalverteilte Messwerte (Abb. 4A). Wenige Proben lagen über dem Schwellenwert ($P75+1,5 \cdot IQR$) für MCT8-aAk- und MCT10-aAk-Positivität; dieser lag bei einem Bindungsindex größer als 2,66 ($BI > 2,66$). Die Prävalenzen der aAk gegen die beiden Transporter waren vergleichbar: 4,2 % (6 von 143) für MCT8-aAk und 6,3 % (9 von 143) für MCT10-aAk. Drei der Proben waren sowohl für MCT8-aAk als auch für MCT10-aAk positiv (Abb. 4B). Die beiden Proben (P1 und P2) mit den höchsten Signalwerten für MCT8-aAk wurden ausgewählt, um weitere Tests für die mögliche funktionelle Rolle *in vitro* durchzuführen.

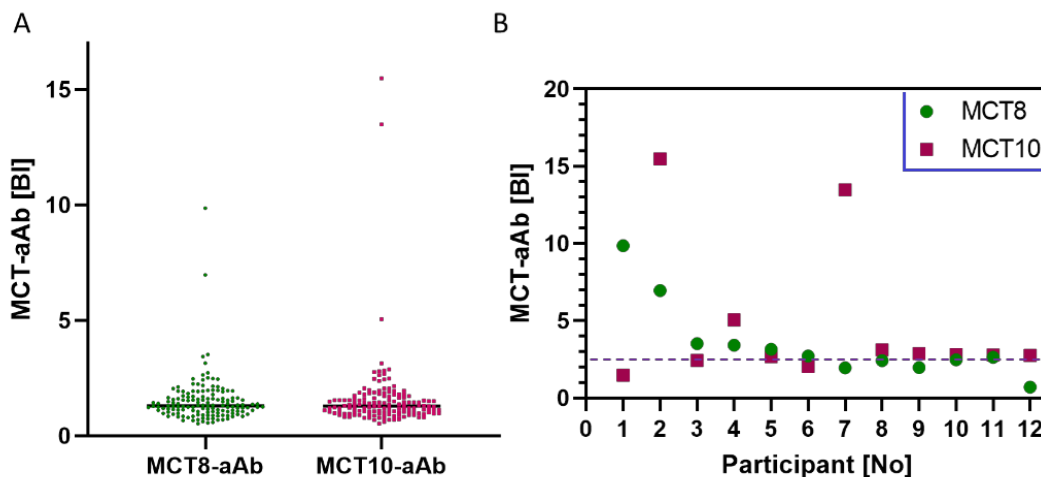


Abb. 4: Prävalenz von MCT8-aAk und MCT10-aAk bei übergewichtigen Jugendlichen

A) Jugendliche ($n = 143$), die an einem Gewichtsreduktionsprogramm teilnahmen, wurden parallel für MCT8-aAk und MCT10-aAk untersucht. Mit dem Ausreißerkriterium der 75. Perzentile plus 1,5 mal dem Interquartilsabstand ($P75+1,5 \cdot IQR$) lässt sich eine Prävalenz von 4,2 % für MCT8 und 6,3 % für MCT10 beobachten.

B) Überblick über die für MCT8-aAk und/oder für MCT10-aAk positiven Personen. Die Daten zeigen, dass einige Proband*innen aAk exprimieren, die beide Transportproteine erkennen. Wahrscheinlich liegt dies an ihrer relativ großen strukturellen und sequenziellen Ähnlichkeit.

Der Bindungsindex (BI) ist neben dem Schwellenwert für Positivität (gestrichelte, horizontale Linie) dargestellt. Grüne Symbole für MCT8-aAk und rote Symbole für MCT10-aAk. Diese Abbildung entspricht unseren Ergebnissen der 2021 publizierte Studie ⁵⁵.

3.3.5. In-vitro-Aktivität von MCT8-aAk beeinflusst die Schilddrüsenhormonaufnahme

Drei positive Proben (P1 bis P3) für MCT8-aAk der Kohorte der übergewichtigen Jugendlichen wurden neben vier negativen Proben (C1 bis C4) ausgewählt, um ihre Interaktion mit rekombinantem MCT8 in vitro zu untersuchen (Abb. 5A). Hierfür wurden MDCK-Zellen, die das rekombinante humane HA-markierte MCT8 exprimierten und solche, die dies nicht exprimierten, gezüchtet und geerntet. Die Zellhomogenate wurden mit positiven Proben, die MCT8-aAk enthielten oder mit Kontrollseren inkubiert. Antikörper-Proteinkomplexe wurden mit Protein A ausgefällt und mit Glycin herausgelöst. Mittels einer SDS-PAGE (Gelelektrophorese) wurden die Proteine ihrer Größe nach in spezifische Banden aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (vgl. Western blot). Durch Ponceau-Färbung wurde sichergestellt, dass der Proteintransfer auf die Membran stattgefunden hat. Nach Zugabe des HA-spezifischen Antikörpers und Milch (zur Blockierung aller unspezifischen Bindungen) wurden die spezifischen Signale mit einem Meerrettichperoxidase-(HRP)-gekoppelten sekundären Antikörper über ein Chemolumineszenzverfahren sichtbar gemacht. Rekombinantes MCT8-Protein wurde folglich durch die HA-Markierung mittels HA-spezifischem Antikörper nachgewiesen (Abb. 5A). Spezifische Signale in der korrekten Höhe wurden allein von den Zellen, die rekombinantes MCT8-Protein exprimierten, nachgewiesen. Dabei waren die Signale am stärksten in der Spur von einer MCT8-aAk-positiven Serumprobe (Probe Nr. 1).

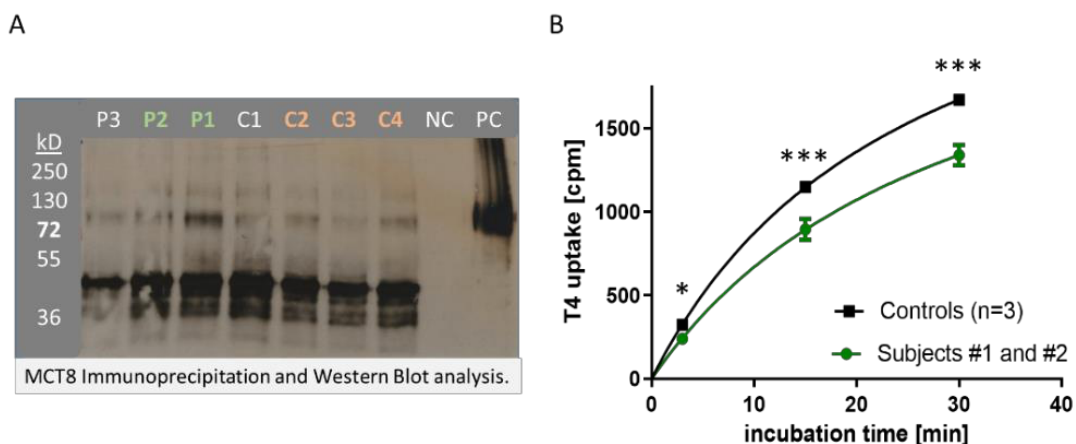


Abb. 5: In vitro Aktivität von MCT8-aAk

A) Immunpräzipitation und Analyse mittels Western Blot von rekombinantem menschlichen MCT8 durch positive Proben (P1-P3) oder negative Kontrollen (C1-C4) für MCT8-aAk.

B) Aufnahme von markiertem T4 in MCT8-exprimierende MDCK-Zellen in Zellkultur in der Gegenwart von Kontroll- (schwarze Kästchen, n = 3) bzw. MCT8-aAk-positiven (grüne Kreise, P1 und P2) Immunglobulinen. Die Dynamik der T4-Aufnahme war ähnlich, aber das Ausmaß der Aufnahme wurde durch die Gegenwart von aus MCT8-aAk-positiven Seren isolierten Immunglobulinen vermindert. Vergleich durch den zweiseitigen nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test, * P < 0,05, *** P < 0,001. Diese Abbildung entspricht unseren Ergebnissen der 2021 publizierten Studie ⁵⁵.

Um die potentiellen biologischen Effekte auf die Schilddrüsenhormonaufnahme in vitro zu untersuchen (Abb. 5B), wurden zwei positive Proben (P1 und P2) zusammen mit drei Kontrollproben ausgewählt. Die potentielle Störung der T4-Aufnahme wurde mittels MDCK-Zellen, die rekombinantes MCT8 exprimierten, getestet. Zunächst wuchsen diese auf Platten bis zur Konfluenz. Die jeweiligen Testseren wurden zusammen mit radioaktiv markiertem Schilddrüsenhormon (¹²⁵I-T4) hinzugegeben und die Zellen wurden nach verschiedenen Zeiträumen geerntet. Die von den Homogenaten gewonnene Signale (in Zählungen pro Minute, cpm) korrespondieren mit dem Grad der Schilddrüsenhormonaufnahme. Diese war bei den Zellen, welche mit MCT8-aAk-negativen Seren inkubiert wurden, signifikant höher als bei denjenigen, die mit MCT8-aAk-positiven Serumproben inkubiert wurden (Abb. 5B). Diese Ergebnisse weisen auf eine potentiell direkte und signifikante Beeinträchtigung der Schilddrüsenhormonaufnahme durch MCT8-aAk hin.

3.4. Diskussion

In dieser Doktorarbeit präsentieren wir Belege, dass die Schilddrüsenhormontransporter MCT8 und MCT10 in verschiedenen Untergruppen humaner Proband*innen als Autoantigene fungieren. Die beiden neu entwickelten Autoantikörper-Assays wurden zunächst jeweils mit einem kommerziellen Immuserum charakterisiert. Positive Serumproben konnten identifiziert und zur vertiefenden Beschreibung der Assay-Eigenschaften verwendet werden. Dies ermöglicht anderen Wissenschaftsteams diese ersten Ergebnisse unabhängig zu wiederholen und zu vergleichen. MCT8-aAk und MCT10-aAk fanden sich in unseren Studien ähnlich häufig bei Jugendlichen und gesunden Erwachsenen. Bei Schilddrüsenpatient*innen war die Prävalenz der aAk um das zwei- bis dreifache erhöht. Allerdings konnte kein Unterschied im Hinblick auf die diagnostizierten Schilddrüsenerkrankungen beobachtet werden. Ebenfalls konnte kein signifikanter Zusammenhang zu den gemessenen Biomarkern der Hypophysen-Schilddrüsen-Achse (totales T4, TSH) hergestellt werden. Mögliche Gründe hierfür sind die kleine Kohorte bzw. der fortlaufende Einschluss der Patient*innen. Das in-vitro-Experiment zeigte, dass MCT8-aAk fähig sind, die T4-Aufnahme zu stören. Dies suggeriert einen potentiellen Beitrag von MCT8-aAk zum individuellen Schilddrüsenhormongehalt sowie am (gestörten) thyreotropen Regelkreis. Es konnte jedoch kein eindeutiger klinischer oder laborchemischer Phänotyp mit den vorhandenen Autoantikörpern assoziiert werden, möglicherweise weil die gemessenen aAk nur von moderaten Konzentrationen waren. Dieser Pilotstudie mit einem Querschnitt aus drei kleineren Probenkohorten sollten longitudinale Analysen größerer Probenkohorten folgen. Eine mögliche Rolle der aAk für Krankheitsprädisposition oder -verlauf konnte bis dato noch nicht abgeleitet werden. Die Vermessung gut charakterisierter größerer Probenkohorten in einem multizentrischen Ansatz sollte in der Lage sein, die potentiell pathogenetische Relevanz von MCT8- und/oder MCT10-aAk zu identifizieren.

Nichtsdestotrotz unterstreicht die Identifikation von MCT8-aAk und MCT10-aAk, dass Schilddrüsenhormontransporter als neue Autoantigene klassifiziert werden können. Die neuen aAk sind somit ein weiterer natürlicher Faktor, der potentiell die SH-Freisetzung und -Signalübertragung beeinträchtigt. Es konnte bereits bewiesen werden, dass Personen sehr individuelle Sollwerte in ihrer Schilddrüsenhormon-Achse aufweisen ²⁵ und deshalb

unterschiedlich auf eine Behandlung mit SH reagieren²⁶. Referenzbereiche bilden den individuellen SH-Status nicht naturgetreu ab, sind jedoch nützlich, um starke Abweichungen einzelner Proband*innen im Vergleich zur Mehrheit einer Population zu diagnostizieren.

Die individuellen Variationen bewegen sich in einer eingeschränkteren Konzentrationsbandbreite als es die Grenzen der normalen Referenzwerte vermuten ließen. Dies erklärt symptomatische Patient*innen mit normwertigen Messwerten, z. B. Serum TSH. Die klinische Relevanz dieser individuellen Sollwerte zeigt sich beim unterschiedlichen Ansprechen auf eine Substitutionsbehandlung mit Thyroxin (T4): Bei den meisten Patient*innen ist es ausreichend, die im Blut gemessenen Parameter einer Hypothyreose (TSH, T3 und T4) in die jeweiligen Normwerte zu bringen. Für das individuelle Wohlbefinden einiger weniger Patient*innen mit engerer Schwankungsbreite ihrer Sollwerte muss diese bei der Therapie jedoch berücksichtigt werden²⁵. Unterschiedlichen Sollwerte der SH-Achse werden üblicherweise molekulargenetisch begründet: Effekte einiger Einzelnukleotid-Polymorphismen (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) in den zentral involvierten Genen^{27, 28} sowie durch verschiedene Genotypen. SNPs, die den peripheren SH-Status und die individuellen Sollwerte beeinflussen, wurden in verschiedenen Genen identifiziert. Diese Gene codieren für zentrale Komponenten der SH-Achse: Thyreotropin-freisetzendes-Hormon-(TRH)-Rezeptor²⁹, Deiodinase Typ 1 oder 2^{30, 31}, SH-Transportermoleküle^{17, 32} und Enzyme des SH-Stoffwechsels³³. Zudem haben einige vererbte Gendefekte die Wichtigkeit bestimmter Gene des SH-Regelkreises unterstrichen: variable Grade an peripherer Schilddrüsen-hormonresistenz entstehen durch Mutation in den codierenden Genen für SH-Rezeptor alpha³⁴ bzw. beta³⁵ und MCT8³⁶. Neben diesen angeborenen Unterschieden der zentralen Bestandteile der SH-Achse wurden analog dazu epigenetische Effekte vorgeschlagen, um die Variabilität zu erklären: bezüglich TRH³⁷, dem TSH-Rezeptor³⁸, dem SH-Rezeptor beta³⁹ oder der Deiodase Typ 3⁴⁰. In dieser Doktorarbeit wird die Auffassung vertreten, dass MCT8-aAk bzw. MCT10-aAk eine weitere Komponente dieser beobachteten Variabilität der SH-Sollwert-Regulierung in einer gegebenen Population darstellen könnte. Ein beachtlicher Teil der gesunden und insbesondere der erkrankten Proband*innen exprimieren aAk gegen MCT8 und/oder MCT10 und damit gegen die wichtigsten derzeit bekannten SH-Transporter.

Die spezifischen Bindungscharakteristika dieser Autoantikörper sowie deren Titer sind überzeugende Parameter, die den SH-Regelkreis und die individuellen SH-Sollwerte beeinflussen könnten.

Immer mehr klinisch wichtige Autoantikörper gegen endokrin relevante Membranproteine werden identifiziert und charakterisiert, daher überrascht die Identifikation von MCT8-aAk und MCT10-aAk nicht. Neben dem bereits erwähnten TSH-Rezeptor konnten die Schilddrüsentransporter Natrium-Iodid-Symporter (NIS) und Pendrin als potentielle Autoantigene der SH-Achse identifiziert werden. Verlässliche Testsysteme zur Detektion dieser aAk wurden entwickelt ^{20, 41}. Besonders hohe und stark voneinander abweichende Prävalenzen wurden anfänglich bei Schilddrüsenpatient*innen ermittelt. In diesen aAk-Assays verwendete man kurze Peptide als Ködermoleküle, wobei es wahrscheinlich zu Kreuzreaktionen kam. Erst in darauffolgenden Studien benutzte man vollständige Proteine in ganzer Länge zur radioaktiven Ligandenbindung ⁴¹ oder zum Nachweis durch Antigen-Reporter-Fusionsproteine ²⁰. Es zeigte sich eine moderate Prävalenz, welche in ihrem Umfang vergleichbar mit den in dieser Doktorarbeit beschriebenen Prävalenzen für MCT8-aAk und MCT10-aAk ist. Longitudinale Studien fehlen aktuell noch, um zu klären, inwiefern sich solche aAk auf die Inzidenz von Schilddrüsenerkrankungen auswirken. Auf Iodid- bzw. SH-Transporter zielende Autoantikörper haben wahrscheinlich eine biologisch aktive Wirkung im Menschen, tragen somit zum individuellen Sollwert des SH-Status und -Regelkreises bei und beeinflussen die individuellen Normwerte für T3, T4 und TSH ⁴².

Diese Auffassung ist vereinbar mit anderen membrangebundenen Transporterantigenen, die die Einschätzung und Voraussage des endokrinen Erkrankungsrisikos beeinflussen, wie z. B. beim autoimmunen Diabetes Mellitus und dem Zink Transporter ZnT8 ^{43, 44}. Autoimmunität gegen ZnT8 ist mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko und hohem Insulinbedarf ⁴⁵ assoziiert. Das Vorhandensein von ZnT8-aAk bei Geschwistern von betroffenen Kindern erhöht deren Erkrankungswahrscheinlichkeit ⁴⁶. Bei Morbus Chagas, einer der häufigsten parasitären Erkrankungen in Mittel- und Südamerika, konnten spezifische stimulierende aAk gegen Adrenorezeptoren (AdrR) nachgewiesen werden, die eine klinische Relevanz für die Spätfolge Kardiomyopathie haben ⁴⁷. Die Detektion von

AdrR-aAk ist jedoch schwierig und es gibt noch keine Routinetests für in-vitro-Analysen ⁴⁸. Im Gegensatz dazu wurden inhibierende AdrR-aAk beim chronischen Fatigue-Syndrom postuliert, wobei diese möglicherweise den adrenergen Signalweg beeinträchtigen ⁴⁹. Eine Validierung des verwendeten diagnostischen Tests fehlt allerdings noch.

Ein weiteres Beispiel für Signalweg-relevante aAk sind die gegen Ionenkanäle gerichtete aAk bei der Myasthenia Gravis. Autoantikörper, die den Acetylcholin-Rezeptor angreifen, stören die Signaltransduktion an der neuromuskulären Endplatte ⁵⁰. Die myasthene Krise stellt einen akuten neurologischen Notfall mit Lungenversagen dar und kann plötzlich (z. B. nach Infektionen) auftreten ⁵¹. Therapeutische Maßnahmen konnten erfreulicherweise verbessert werden und die Krankheitsschwere kann nun durch pharmakologische Intervention gemindert werden ⁵².

In unserer Arbeitsgruppe wurden zuletzt aAk gegen den Insulin-like Growth Faktor 1 Rezeptor (IGF-1R) studiert. Diese stören die IGF-1 Signalübertragung ¹⁹ und konnten mit körperlicher Schwäche bei jugendlichen Proband*innen assoziiert werden ²¹. Betrachtet man die breite Relevanz von IGF-1 in Entwicklung und Krankheit sind weitere physiologische Effekte wahrscheinlich. Durch die Charakterisierung der Insulinresistenz Typ B wird diese Auffassung untermauert: Es handelt sich um eine potentiell lebensbedrohliche Krankheit mit einer hohen aAk-Last gegen den Insulinrezeptor ⁵³. Therapeutische Interventionen sind mittlerweile in der Lage, diese überwältigende aAk-Last zu kontrollieren und den betroffenen Patient*innen zu helfen ⁵⁴.

Unsere Ergebnisse sind von allgemeiner Relevanz für die SH-Achse sobald Patient*innen mit außerordentlich hohen Leveln und endokrin störender Aktivität von MCT8-aAk oder MCT10-aAk identifiziert werden. Die neuen Assays für MCT8-aAk und MCT10-aAk werden diese Identifizierung und somit die therapeutische Kontrolle von Proband*innen mit störender natürlicher Autoimmunität gegenüber der SH-Aufnahme ermöglichen.

Daraus schlussfolgern wir, dass eine Untergruppe Jugendlicher und Erwachsener nachweisbare Mengen von MCT8-aAk und/oder MCT10-aAk exprimieren und dass diese möglicherweise den individuellen Sollwert der SH-Achse beeinflussen. Die erhöhte Prävalenz von MCT8-aAk und MCT10-aAk bei Schilddrüsenpatient*innen deutet auf eine

potentiell diagnostische Relevanz dieser aAk hin, obwohl ihre Präsenz nicht mit einer speziellen Form der Schilddrüsenerkrankung assoziiert war und noch keine sehr hohen Konzentrationen beobachtet wurden. Diese hohen Konzentrationen könnten bei Patient*innen mit unerklärlicher Resistenz gegenüber Schilddrüsenhormonen vorkommen. Die neu aufgebauten Assays sind für Screening-Versuche geeignet, da sie einen hohen Durchlauf ermöglichen, zudem sind sie sehr robust und sensitiv. Sie bilden eine solide Basis, um die Analysen auf große prospektive epidemiologische Studien auszudehnen. Diese sollten als nächstes durchgeführt werden, parallel zur Forschung an Proband*innen mit seltenen Mustern des SH-Status. Diese Muster beruhen möglicherweise nicht auf einem genetischen Defekt, sondern auf einer autoimmunbedingten Hemmung des Schilddrüsenhormontransports.

3.5. Bibliografie

1. Kohrle, J., Selenium and the thyroid. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **2013**, *20* (5), 441-8.
2. Kohrle, J., Thyroid Hormones and Derivatives: Endogenous Thyroid Hormones and Their Targets. *Methods Mol Biol* **2018**, *1801*, 85-104.
3. Goichot, B.; Leenhardt, L.; Massart, C.; Raverot, V.; Tramalloni, J.; Iraqi, H.; Consensus, w.-g., Diagnostic procedure in suspected Graves' disease. *Ann Endocrinol (Paris)* **2018**, *79* (6), 608-617.
4. Kahaly, G. J.; Diana, T., TSH Receptor Antibody Functionality and Nomenclature. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2017**, *8*, 28.
5. Morshed, S. A.; Davies, T. F., Graves' Disease Mechanisms: The Role of Stimulating, Blocking, and Cleavage Region TSH Receptor Antibodies. *Horm Metab Res* **2015**, *47* (10), 727-34.
6. McLachlan, S. M.; 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.
7. Schomburg, L., Selenium, selenoproteins and the thyroid gland: interactions in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* **2011**, *8* (3), 160-71.
8. Bernal, J.; Guadano-Ferraz, A.; Morte, B., Thyroid hormone transporters-functions and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol* **2015**, *11* (12), 690.
9. Schweizer, U.; Johannes, J.; Bayer, D.; Braun, D., Structure and function of thyroid hormone plasma membrane transporters. *Eur Thyroid J* **2014**, *3* (3), 143-53.
10. Felmlee, M. A.; Jones, R. S.; Rodriguez-Cruz, V.; Follman, K. E.; Morris, M. E., Monocarboxylate Transporters (SLC16): Function, Regulation, and Role in Health and Disease. *Pharmacol Rev* **2020**, *72* (2), 466-485.
11. Friesema, E. C.; Grueters, A.; Biebermann, H.; Krude, H.; von Moers, A.; Reeser, M.; Barrett, T. G.; Mancilla, E. E.; Svensson, J.; Kester, M. H.; Kuiper, G. G.; Balkassmi, S.; Uitterlinden, A. G.; Koehle, J.; Rodien, P.; Halestrap, A. P.; Visser, T. J., Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet* **2004**, *364* (9443), 1435-7.
12. Dumitrescu, A. M.; Liao, X. H.; Best, T. B.; Brockmann, K.; Refetoff, S., A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *Am J Hum Genet* **2004**, *74* (1), 168-75.
13. Schwartz, C. E.; Stevenson, R. E., The MCT8 thyroid hormone transporter and Allan-Herndon-Dudley syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **2007**, *21* (2), 307-21.
14. Groeneweg, S.; van Geest, F. S.; Abaci, A.; Alcantud, A.; Ambegaonkar, G. P.; Armour, C. M.; Bakhtiani, P.; Barca, D.; Bertini, E. S.; van Beynum, I. M.; Brunetti-Pierri, N.; Bugiani, M.; Cappa, M.; Cappuccio, G.; Castellotti, B.; Castiglioni, C.; Chatterjee, K.; de Coo, I. F. M.; Coutant, R.; Craiu, D.; Crock, P.; DeGoede, C.; Demir, K.; Dica, A.; Dimitri, P.; Dolcetta-Capuzzo, A.; Dremmen, M. H. G.; Dubey, R.; Enderli, A.; Fairchild, J.; Gallichan, J.; George, B.; Gevers, E. F.; Hackenberg, A.; Halasz, Z.; Heinrich, B.; Huynh, T.; Klosowska, A.; van der Knaap, M. S.; van der Knoop, M. M.; Konrad, D.; Koolen, D. A.; Krude, H.; Lawson-Yuen, A.; Lebl, J.; Linder-Lucht, M.; Lorea, C. F.; Lourenco, C. M.; Lunsing, R. J.; Lyons, G.; Malikova, J.; Mancilla, E. E.; McGowan, A.; Mericq, V.; Lora, F. M.; Moran, C.; Muller, K. E.; Oliver-Petit, I.; Paone, L.; Paul, P. G.; Polak, M.; Porta, F.; Poswar, F. O.; Reinauer, C.; Rozenkova, K.; Menevse, T. S.; Simm, P.; Simon, A.; Singh, Y.; Spada, M.; van der Spek, J.; Stals, M. A. M.; Stoupa, A.; Subramanian, G. M.; Tonduti, D.; Turan, S.; den Uil, C. A.; Vanderniet, J.; van der Walt, A.; Wemeau, J. L.; Wierzba, J.; de Wit, M. Y.; Wolf, N. I.; Wurm, M.; Zibordi, F.; Zung, A.; Zwaveling-Soonawala, N.; Visser, W. E., Disease characteristics of MCT8 deficiency: an international, retrospective, multicentre cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol* **2020**, *8* (7), 594-605.
15. Grijota-Martinez, C.; Barez-Lopez, S.; Gomez-Andres, D.; Guadano-Ferraz, A., MCT8 Deficiency: The Road to Therapies for a Rare Disease. *Front Neurosci* **2020**, *14*, 380.
16. Groeneweg, S.; Peeters, R. P.; Moran, C.; Stoupa, A.; Auriol, F.; Tonduti, D.; Dica, A.; Paone, L.; Rozenkova, K.; Malikova, J.; van der Walt, A.; de Coo, I. F. M.; McGowan, A.; Lyons, G.; Aarsen, F. K.; Barca, D.; van Beynum, I. M.; van der Knoop, M. M.; Jansen, J.; Manshande, M.; Lunsing, R. J.; Nowak, S.; den Uil, C. A.; Zillikens, M. C.; Visser, F. E.; Vrijmoeth, P.; de Wit, M. C. Y.; Wolf, N. I.; Zandstra, A.; Ambegaonkar, G.; Singh, Y.; de Rijke, Y. B.; Medici, M.; Bertini, E. S.; Depoorter, S.; Lebl, J.; Cappa, M.; De Meirleir, L.; Krude, H.; Craiu, D.; Zibordi, F.; Oliver Petit, I.; Polak, M.; Chatterjee, K.; Visser, T. J.; Visser, W. E., Effectiveness and safety of the tri-iodothyronine analogue Triac in children and adults with

- MCT8 deficiency: an international, single-arm, open-label, phase 2 trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* **2019**, *7* (9), 695-706.
17. Fu, J.; Korwutthikulrangsri, M.; Ramos-Platt, L.; Pierson, T. M.; Liao, X. H.; Refetoff, S.; Weiss, R. E.; Dumitrescu, A. M., Sorting Variants of Unknown Significance Identified by Whole Exome Sequencing: Genetic and Laboratory Investigations of Two Novel MCT8 Variants. *Thyroid* **2020**, *30* (3), 463-465.
 18. Braun, D.; Lelios, I.; Krause, G.; Schweizer, U., Histidines in potential substrate recognition sites affect thyroid hormone transport by monocarboxylate transporter 8 (MCT8). *Endocrinology* **2013**, *154* (7), 2553-61.
 19. Minich, W. B.; Dehina, N.; Welsink, T.; Schwiebert, C.; Morgenthaler, N. G.; Kohrle, J.; Eckstein, A.; Schomburg, L., Autoantibodies to the IGF1 receptor in Graves' orbitopathy. *J Clin Endocrinol Metab* **2013**, *98* (2), 752-60.
 20. Eleftheriadou, A. M.; Mehl, S.; Renko, K.; Kasim, R. H.; Schaefer, J. A.; Minich, W. B.; Schomburg, L., Re-visiting autoimmunity to sodium-iodide symporter and pendrin in thyroid disease. *Eur J Endocrinol* **2020**, *183* (6), 571-580.
 21. Schwiebert, C.; Kuhnen, P.; Becker, N. P.; Welsink, T.; Keller, T.; Minich, W. B.; 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).
 22. Bau, A. M.; Ernert, A.; Krude, H.; Wiegand, S., Hormonal regulatory mechanisms in obese children and adolescents after previous weight reduction with a lifestyle intervention: maintain - paediatric part - a RCT from 2009-15. *BMC Obes* **2016**, *3*, 29.
 23. Mehl, S.; Sun, Q.; Gorlich, C. L.; Hackler, J.; Kopp, J. F.; 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.
 24. Johannes, J.; Jayarama-Naidu, R.; Meyer, F.; Wirth, E. K.; Schweizer, U.; Schomburg, L.; Kohrle, J.; Renko, K., Silychristin, a Flavonolignan Derived From the Milk Thistle, Is a Potent Inhibitor of the Thyroid Hormone Transporter MCT8. *Endocrinology* **2016**, *157* (4), 1694-701.
 25. Andersen, S.; Bruun, N. H.; Pedersen, K. M.; Laurberg, P., Biologic variation is important for interpretation of thyroid function tests. *Thyroid* **2003**, *13* (11), 1069-78.
 26. Hoermann, R.; Midgley, J. E. M.; Larisch, R.; Dietrich, J. W., Functional and Symptomatic Individuality in the Response to Levothyroxine Treatment. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2019**, *10*, 664.
 27. Panicker, V., Genetics of thyroid function and disease. *Clin Biochem Rev* **2011**, *32* (4), 165-75.
 28. Medici, M.; Visser, W. E.; Visser, T. J.; Peeters, R. P., Genetic determination of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis: where do we stand? *Endocr Rev* **2015**, *36* (2), 214-44.
 29. Brigante, G.; Spaggiari, G.; Santi, D.; Cioni, K.; Gnarini, V.; Diazi, C.; Pignatti, E.; Casarini, L.; Marino, M.; Tuttmann, F.; Carani, C.; Simoni, M., The TRHR Gene Is Associated with Hypothalamo-Pituitary Sensitivity to Levothyroxine. *Eur Thyroid J* **2014**, *3* (2), 101-8.
 30. Kazukauskienė, N.; Skiriute, D.; Gustiene, O.; Burkauskas, J.; Zaliunaite, V.; Mickuviene, N.; Brozaitiene, J., Importance of Thyroid Hormone level and Genetic Variations in Deiodinases for Patients after Acute Myocardial Infarction: A Longitudinal Observational Study. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 9169.
 31. Hoftijzer, H. C.; Heemstra, K. A.; Visser, T. J.; le Cessie, S.; Peeters, R. P.; Corssmit, E. P.; Smit, J. W., The type 2 deiodinase ORFa-Gly3Asp polymorphism (rs12885300) influences the set point of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in patients treated for differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **2011**, *96* (9), E1527-33.
 32. van der Deure, W. M.; Peeters, R. P.; Visser, T. J., 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), 1-11.
 33. Teumer, A.; Chaker, L.; Groeneweg, S.; Li, Y.; Di Munno, C.; Barbieri, C.; Schultheiss, U. T.; Traglia, M.; Ahluwalia, T. S.; Akiyama, M.; Appel, E. V. R.; Arking, D. E.; Arnold, A.; Astrup, A.; Beekman, M.; Beilby, J. P.; Bekaert, S.; Boerwinkle, E.; Brown, S. J.; De Buyzere, M.; Campbell, P. J.; Ceresini, G.; Cerqueira, C.; Cucca, F.; Deary, I. J.; Deelen, J.; Eckardt, K. U.; Ekici, A. B.; Eriksson, J. G.; Ferrucci, L.; Fiers, T.; Fiorillo, E.; Ford, I.; Fox, C. S.; Fuchsberger, C.; Galesloot, T. E.; Gieger, C.; Gogele, M.; De Grandi, A.; Grarup, N.; Greiser, K. H.; Haljas, K.; Hansen, T.; Harris, S. E.; van Heemst, D.; den Heijer, M.; Hicks, A. A.; den Hollander, W.; Homuth, G.; Hui, J.; Ikram, M. A.; Itermann, T.; Jensen, R. A.; Jing, J.; Jukema, J. W.; Kajantie, E.; Kamatani, Y.; Kasbohm, E.; Kaufman, J. M.; Kiemeny, L. A.; Kloppenburg, M.; Kronenberg, F.; Kubo, M.; Lahti, J.; Lapauw, B.; Li, S.; Liewald, D. C. M.; Lifelines Cohort, S.; Lim, E. M.; Linneberg, A.; Marina, M.; Mascalzoni, D.; Matsuda, K.; Medenwald,

- D.; Meisinger, C.; Meulenbelt, I.; De Meyer, T.; Meyer Zu Schwabedissen, H. E.; Mikolajczyk, R.; Moed, M.; Netea-Maier, R. T.; Nolte, I. M.; Okada, Y.; Pala, M.; Pattaro, C.; Pedersen, O.; Petersmann, A.; Porcu, E.; Postmus, I.; Pramstaller, P. P.; Psaty, B. M.; Ramos, Y. F. M.; Rawal, R.; Redmond, P.; Richards, J. B.; Rietzschel, E. R.; Rivadeneira, F.; Roef, G.; Rotter, J. I.; Sala, C. F.; Schlessinger, D.; Selvin, E.; Slagboom, P. E.; Soranzo, N.; Sorensen, T. I. A.; Spector, T. D.; Starr, J. M.; Stott, D. J.; Taes, Y.; Taliun, D.; Tanaka, T.; Thuesen, B.; Tiller, D.; Toniolo, D.; Uitterlinden, A. G.; Visser, W. E.; Walsh, J. P.; Wilson, S. G.; Wolffenbuttel, B. H. R.; Yang, Q.; Zheng, H. F.; Cappola, A.; Peeters, R. P.; Naitza, S.; Volzke, H.; Sanna, S.; Kottgen, A.; Visser, T. J.; Medici, M., Genome-wide analyses identify a role for SLC17A4 and AADAT in thyroid hormone regulation. *Nat Commun* **2018**, 9 (1), 4455.
34. van Gucht, A. L. M.; Moran, C.; Meima, M. E.; Visser, W. E.; Chatterjee, K.; Visser, T. J.; Peeters, R. P., Resistance to Thyroid Hormone due to Heterozygous Mutations in Thyroid Hormone Receptor Alpha. *Curr Top Dev Biol* **2017**, 125, 337-355.
35. Fujisawa, H.; Gagne, J.; Dumitrescu, A. M.; Refetoff, S., Very Severe Resistance to Thyroid Hormone beta in One of Three Affected Members of a Family with a Novel Mutation in the THRB Gene. *Thyroid* **2019**, 29 (10), 1518-1520.
36. Fu, J.; Dumitrescu, A. M., Inherited defects in thyroid hormone cell-membrane transport and metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **2014**, 28 (2), 189-201.
37. Umezawa, R.; Yamada, M.; Horiguchi, K.; Ishii, S.; Hashimoto, K.; Okada, S.; Satoh, T.; Mori, M., Aberrant histone modifications at the thyrotropin-releasing hormone gene in resistance to thyroid hormone: analysis of F455S mutant thyroid hormone receptor. *Endocrinology* **2009**, 150 (7), 3425-32.
38. Khan, M. S.; Pandith, A. A.; Masoodi, S. R.; Wani, K. A.; Ul Hussain, M.; Mudassar, S., Epigenetic silencing of TSHR gene in thyroid cancer patients in relation to their BRAF V600E mutation status. *Endocrine* **2014**, 47 (2), 449-55.
39. Ling, Y.; Shi, X.; Wang, Y.; Ling, X.; Li, Q., Down-regulation of thyroid hormone receptor beta1 gene expression in gastric cancer involves promoter methylation. *Biochem Biophys Res Commun* **2014**, 444 (2), 147-52.
40. Hernandez, A.; Stohn, J. P., The Type 3 Deiodinase: Epigenetic Control of Brain Thyroid Hormone Action and Neurological Function. *Int J Mol Sci* **2018**, 19 (6).
41. Brix, T. H.; Hegedus, L.; Weetman, A. P.; Kemp, H. E., 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.
42. Andersen, S.; Pedersen, K. M.; Bruun, N. H.; Laurberg, P., Narrow individual variations in serum T(4) and T(3) in normal subjects: a clue to the understanding of subclinical thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* **2002**, 87 (3), 1068-72.
43. Sorgjerd, E. P.; Skorpen, F.; Kvaloy, K.; Midthjell, K.; Grill, V., Prevalence of ZnT8 antibody in relation to phenotype and SLC30A8 polymorphism in adult autoimmune diabetes: results from the HUNT study, Norway. *Autoimmunity* **2013**, 46 (1), 74-9.
44. Achenbach, P.; Lampasona, V.; Landherr, U.; Koczwara, K.; Krause, S.; Grallert, H.; Winkler, C.; Pfluger, M.; Illig, T.; Bonifacio, E.; Ziegler, A. G., Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLC30A8 genotype stratify type 1 diabetes risk. *Diabetologia* **2009**, 52 (9), 1881-8.
45. Kawasaki, E.; Nakamura, K.; Kuriya, G.; Satoh, T.; Kuwahara, H.; Kobayashi, M.; Abiru, N.; Yamasaki, H.; Eguchi, K., Autoantibodies to insulin, insulinoma-associated antigen-2, and zinc transporter 8 improve the prediction of early insulin requirement in adult-onset autoimmune diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **2010**, 95 (2), 707-13.
46. Burke, G. W., 3rd; Vendrame, F.; Viridi, S. K.; Ciancio, G.; Chen, L.; Ruiz, P.; Messinger, S.; Reijonen, H. K.; Pugliese, A., Lessons From Pancreas Transplantation in Type 1 Diabetes: Recurrence of Islet Autoimmunity. *Curr Diab Rep* **2015**, 15 (12), 121.
47. Wallukat, G.; Munoz Saravia, S. G.; Haberland, A.; Bartel, S.; Araujo, R.; Valda, G.; Duchon, D.; Diaz Ramirez, I.; Borges, A. C.; Schimke, I., Distinct patterns of autoantibodies against G-protein-coupled receptors in Chagas' cardiomyopathy and megacolon. Their potential impact for early risk assessment in asymptomatic Chagas' patients. *J Am Coll Cardiol* **2010**, 55 (5), 463-8.
48. Boege, F.; Westenfeld, R.; Jahns, R., beta1AAb Determined by Peptide ELISA: A Signal in the Noise? *J Am Coll Cardiol* **2017**, 70 (6), 807-808.
49. Loebel, M.; Grabowski, P.; Heidecke, H.; Bauer, S.; Hanitsch, L. G.; Wittke, K.; Meisel, C.; Reinke, P.; Volk, H. D.; Fluge, O.; Mella, O.; Scheibenbogen, C., Antibodies to beta adrenergic and

- muscarinic cholinergic receptors in patients with Chronic Fatigue Syndrome. *Brain Behav Immun* **2016**, *52*, 32-39.
50. Hara, H.; Hayashi, K.; Ohta, K.; Itoh, N.; Nishitani, H.; Ohta, M., Detection and characterization of blocking-type anti-acetylcholine receptor antibodies in sera from patients with myasthenia gravis. *Clin Chem* **1993**, *39* (10), 2053-7.
51. Roper, J.; Fleming, M. E.; Long, B.; Koyfman, A., Myasthenia Gravis and Crisis: Evaluation and Management in the Emergency Department. *J Emerg Med* **2017**, *53* (6), 843-853.
52. Ciafaloni, E., Myasthenia Gravis and Congenital Myasthenic Syndromes. *Continuum (Minneap Minn)* **2019**, *25* (6), 1767-1784.
53. Lupsa, B. C.; Chong, A. Y.; Cochran, E. K.; Soos, M. A.; Semple, R. K.; Gorden, P., Autoimmune forms of hypoglycemia. *Medicine (Baltimore)* **2009**, *88* (3), 141-153.
54. Censi, S.; Mian, C.; Betterle, C., Insulin autoimmune syndrome: from diagnosis to clinical management. *Ann Transl Med* **2018**, *6* (17), 335.
55. Porst, T.; Johannes, J.; Gluschke, H.; Köhler, R.; Mehl, S.; Kühnen, P.; Renko, K.; Minich, W.B.; Wiegand, S.; Schomburg, L. Natural Autoimmunity to the Thyroid Hormone Monocarboxylate Transporters MCT8 and MCT10. *Biomedicines* **2021**, *9*, 496.

4. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Theresa Porst, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Detection and Physiological Role of Autoimmunity against Thyroid Hormone Transporters (Schilddrüsenhormontransporter als Autoantigene im Menschen und die Etablierung eines Nachweisverfahrens für Autoantikörper gegen die Monocarboxylat-Transporter 8 und 10) 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, Grafiken 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) 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

5. Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Theresa Porst hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Autoren: Theresa Porst, Jörg Johannes, Hans Gluschke, Richard Köhler, Sebastian Mehl, Peter Kühnen, Kostja Renko, Waldemar B. Minich, Susanna Wiegand, Lutz Schomburg

Titel: Natural autoimmunity to the thyroid hormone monocarboxylate transporters MCT8 and MCT10

Zeitschrift: Biomedicines by MDPI, **Erscheinungsjahr:** 2021

Impact Faktor: 4,7 (Stand: März 2021)

Vertiefung des Studiendesigns und Mitarbeit an der Fragestellung

Literaturrecherche

Laborarbeit:

Versuchsvorarbeiten und Beiträge zur Assay Etablierung und Optimierung

Mitarbeit bei den HEK293 und MDCK-1 Zellkulturversuchen

Kultivierung der Proteinextrakte

Durchführung der MCT8- und MCT10-aAk-Assays in der MAINTAIN Kohorte

Quantifizierung der gemessenen Autoantikörper

Statistische Auswertung der erhobenen Daten mit GraphPad Prism 4.0

Interpretation der Ergebnisse

Extraktion von Immunglobulinen aus Serum

Immunopräzipitation, Gelelektrophorese und Western blot

Erstellung von Grafiken zur Präsentation der Ergebnisse

Anfertigung des Manuskripts:

Selbstständige Erarbeitung der ersten Fassung des Manuskripts

Ausführliche Formulierung des Methodenteils

Erstellung der Grafiken Fig. 3 A und B, sowie Fig. 4 A, Mitwirkung bei 4 B

Begleitung des Peer-Review Prozesses

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

6. Auszug aus der Journal Summary List

Biomedicines ist auf Rang 36 von 270 Journalen (Q1 bis 68) und damit ein Top Journal.

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2019** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"PHARMACOLOGY and PHARMACY"** Selected Category
 Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 270 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY	33,154	64.797	0.049170
2	PHARMACOLOGICAL REVIEWS	12,500	17.395	0.010370
3	TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES	13,034	13.503	0.017780
4	ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS	36,796	13.300	0.033170
5	Annual Review of Pharmacology and Toxicology	7,812	11.250	0.007970
6	DRUG RESISTANCE UPDATES	3,165	11.000	0.004220
7	PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS	16,615	10.557	0.023490
8	MEDICINAL RESEARCH REVIEWS	4,974	9.300	0.005360
9	BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY	34,040	7.730	0.031300
10	JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE	49,132	7.727	0.051270
11	ALIMENTARY PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS	21,233	7.515	0.032840
12	DRUG DISCOVERY TODAY	15,022	7.321	0.020720
13	Acta Pharmaceutica Sinica B	3,560	7.097	0.006580
14	NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	26,281	6.751	0.040680
15	European Heart Journal-Cardiovascular Pharmacotherapy	521	6.696	0.001640
16	CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS	16,749	6.565	0.018290
17	DRUGS	11,128	6.189	0.014190
18	Neurotherapeutics	4,998	6.035	0.009520
19	PHARMACOLOGICAL RESEARCH	13,517	5.893	0.019090
20	EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS	3,350	5.611	0.005090

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
21	EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS	5,169	5.473	0.007470
22	JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY	32,470	5.439	0.048840
23	BIODRUGS	1,803	5.313	0.002980
24	International Journal of Nanomedicine	23,279	5.115	0.028200
25	EXPERT OPINION ON INVESTIGATIONAL DRUGS	4,833	5.081	0.006230
26	ACTA PHARMACOLOGICA SINICA	9,668	5.064	0.009310
27	BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY	27,929	4.960	0.020770
28	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY	67,707	4.904	0.082760
29	DRUG DELIVERY	5,590	4.902	0.008420
30	Expert Opinion on Drug Discovery	3,427	4.887	0.006290
31	INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS	48,995	4.845	0.034660
32	Expert Opinion on Drug Delivery	6,690	4.838	0.007220
33	CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY	6,720	4.807	0.009270
34	CNS DRUGS	4,768	4.786	0.007670
35	JOURNAL OF FOOD AND DRUG ANALYSIS	3,897	4.727	0.005550
36	Biomedicines	1,156	4.717	0.002850
37	Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology	805	4.700	0.000670
38	Current Neuropharmacology	4,178	4.668	0.006280
39	INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS	12,403	4.621	0.017890
40	CLINICAL PHARMACOKINETICS	8,919	4.604	0.008920
40	EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS	16,822	4.604	0.014330
42	BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY	25,449	4.545	0.041300

Article

Natural Autoimmunity to the Thyroid Hormone Monocarboxylate Transporters MCT8 and MCT10

Theresa Porst ¹, Jörg Johannes ¹, Hans Gluschke ¹, Richard Köhler ¹, Sebastian Mehl ¹, Peter Kühnen ², Kostja Renko ¹, Waldemar B. Minich ¹, Susanna Wiegand ² and Lutz Schomburg ^{1,*}

¹ Institute for Experimental Endocrinology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt Universität zu Berlin, D-10115 Berlin, Germany; theresaporst@gmx.de (T.P.); johannes@web.de (J.J.); hans.gluschke@charite.de (H.G.); richard.koehler@charite.de (R.K.); sebastian.mehl@mac.com (S.M.); kostja.renko@charite.de (K.R.); waldemar.minich@charite.de (W.B.M.)

² Department of Paediatric Endocrinology and Diabetology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt Universität zu Berlin, D-13353 Berlin, Germany; peter.kuehnen@charite.de (P.K.); susanna.wiegand@charite.de (S.W.)

* Correspondence: lutz.schomburg@charite.de

Citation: Porst, T.; Johannes, J.; Gluschke, H.; Köhler, R.; Mehl, S.; Kühnen, P.; Renko, K.; Minich, W.B.; Wiegand, S.; Schomburg, L. Natural Autoimmunity to the Thyroid Hormone Monocarboxylate Transporters MCT8 and MCT10. *Biomedicines* **2021**, *9*, 496. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050496>

Academic Editors: Marek Drozdziak and Jun Lu

Received: 27 March 2021

Accepted: 29 April 2021

Published: 30 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The monocarboxylate transporters 8 (MCT8) and 10 (MCT10) are important for thyroid hormone (TH) uptake and signaling. Reduced TH activity is associated with impaired development, weight gain and discomfort. We hypothesized that autoantibodies (aAb) to MCT8 or MCT10 are prevalent in thyroid disease and obesity. Analytical tests for MCT8-aAb and MCT10-aAb were developed and characterized with commercial antiserum. Serum samples from healthy controls, thyroid patients and young overweight subjects were analyzed, and prevalence of the aAb was compared. MCT8-aAb were additionally tested for biological effects on thyroid hormone uptake in cell culture. Positive MCT8-aAb and MCT10-aAb were detected in all three clinical cohorts analyzed. MCT8-aAb were most prevalent in thyroid patients (11.9%) as compared to healthy controls (3.8%) and overweight adolescents (4.2%). MCT8-aAb positive serum reduced T4 uptake in cell culture in comparison to MCT8-aAb negative control serum. Prevalence of MCT10-aAb was highest in the group of thyroid patients as compared to healthy subjects or overweight adolescents (9.0% versus 4.5% and 6.3%, respectively). We conclude that MCT8 and MCT10 represent autoantigens in humans, and that MCT8-aAb may interfere with regular TH uptake and signaling. The increased prevalence of MCT8-aAb and MCT10-aAb in thyroid disease suggests that their presence may be of pathophysiological relevance. This hypothesis deserves an analysis in large prospective studies.

Keywords: thyroid hormone; transport; thyroid axis; autoimmunity

1. Introduction

The majority of thyroid hormones (TH) circulating in blood are not free, but bound to TH binding proteins due to their hydrophobic nature, namely to albumin, thyroxine binding globulin, and transthyretin, respectively. In order to exert TH signaling via the nuclear TH receptors, TH need to pass the plasma membrane of target cells [1]. However, TH are charged amino acid derivatives and unable to diffuse across the hydrophobic membrane segments. Transmembrane proteins enabling passive TH passage or capable of actively transporting TH are therefore essentially needed [2]. There is a large number of potential TH transporters differing in structure, expression pattern, transport preferences and regulation of biosynthesis, activity and trafficking [3]. The family of monocarboxylate transporters (MCT) are of specific interest as MCT8 (solute carrier family 16 member 2, SCL16A2) was the first TH transporter identified to be causally involved in an inherited human disease, i.e., causative for the Allan–Herndon–Dudley syndrome

(AHDS) [4,5]. The gene encoding MCT8 (*SLC16A2*) is located on the X-chromosome, and transport-impeding mutations in *SLC16A2* are interfering with regular TH signaling, thereby disturbing muscular, neuronal and intellectual development. The affected children display severe congenital hypotonia and may develop spasticity and generalized muscle weakness [6]. The disease often presents with a debilitating phenotype, apparently caused by severe cerebral hypothyroidism in combination with peripheral thyrotoxicosis [7]. Different therapeutic routes are discussed [8], and first clinical trials are conducted in young and adult patients affected by AHDS [9]. In case of prenatal diagnosis, therapy is attempted by treating the fetus via the pregnant mother [10]. MCT10 (*SCL16A10*) constitutes a second TH transporter of high similarity to MCT8 both in sequence, structure and transport characteristics [11]. Genetic defects in *SCL16A10* have not been identified, yet.

Besides mutations and polymorphisms in the genes encoding central components of the TH axis, circulating autoantibodies (aAb) are also capable of interfering with regular TH status and feedback control. The G-protein coupled thyrotropin (TSH) receptor (TSHR) of the thyroid gland is probably the most illuminating example of a central component of the TH axis that can be affected by the immune system, as neutral, blocking and stimulating aAb to the TSHR have been identified and characterized [12,13]. The detection and characterization of TSHR-aAb is the leading criterion in the diagnosis of Graves' disease [14,15].

With the characterization of MCT8 as an essential plasma membrane transporter for peripheral and central TH uptake that is directly exposed to the circulation, we decided to test whether MCT8 may constitute an autoantigen in human subjects. To this end, we established novel quantitative aAb assays to human MCT8 and in parallel to the highly related MCT10 molecule, and assessed the prevalence of MCT8-aAb and MCT10-aAb in three groups of subjects, i.e., healthy adults, overweight adolescents and thyroid patients. The inclusion of a group of obese subjects was of particular relevance, as obesity increases the risk for autoimmunity due to the interference of fat-derived adipokines with the immune system [16–19], and the potential consequence of autoimmune thyroid disease and a suppressed TH status causing weight gain and diabetes risk [20–22]. The rationale for choosing these groups of subjects lies in the hypothesis that inhibitory aAb to MCT8 or MCT10 would modify thyroid gland function, TH status and energy homeostasis. Indeed, positive subjects for MCT8-aAb and MCT10-aAb were identified and a particularly elevated prevalence of MCT8-aAb was observed in thyroid disease.

2. Materials and Methods

2.1. Human Samples

For the assessment of the prevalence of MCT8-aAb and MCT10-aAb in the general population, serum samples from adult subjects ($n = 400$, 50% females, self-reported health status as healthy) were purchased from a commercial supplier (in.vent Diagnostica GmbH, Hennigsdorf, Germany). Ethical clearance and written informed consent had been granted to the commercial supplier who provided the samples after pseudonymization. A potential relevance of MCT8-aAb and MCT10-aAb for metabolism and weight control was tested in a cohort of obese adolescents ($n = 142$) participating in the "MAINTAIN" intervention trial for body weight reduction [23]. Serum samples had been collected at the obesity outpatient clinic of Paediatric Endocrinology and Diabetology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Germany. Informed consent of the subjects and/or one or both parent(s) was obtained prior to study entry, and the study had been registered at Clinical Trials (NCT00850629).

A potential relation of MCT8-aAb and MCT10-aAb to thyroid disease was tested in a cross-sectional study of adult thyroid patients visiting an outpatient clinic ($n = 318$). The study was conducted in Berlin, Germany, and patients were enrolled consecutively independent of thyroid disease type and ongoing therapy. All participants provided written informed consent before enrolment [24]. Both clinical studies had been approved by the

Ethical committee of Charité-Universitätsmedizin, Berlin, in 2009 and 2017, respectively (#EA2/015/09 and #EA2/173/17). The studies were conducted in accordance with the guidelines in the Declaration of Helsinki. All samples were analyzed by personnel blinded to the clinical characteristics, and in a research lab remote from the clinical sites.

2.2. Commercial Antibodies

In order to test assay performance, suitability for clinical analyses, and to gain some insight into the detection limit of the newly generated assays, one commercial antiserum to human MCT8 and one to human MCT10, respectively, were purchased (novus biologicals, Europe Office Bio-Techne GmbH, Wiesbaden, Germany, cat. no. NBP2-57308, lot #A117467, and Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany, prestige antibodies, cat. no. HPA016860, lot #B106546). The commercial antiserum samples were diluted in human serum as the preferred analytical matrix.

2.3. Construction of MCT8 and MCT10 Luciferase Fusion Proteins for aAb Detection

The open reading frames encoding human MCT8 and human MCT10, respectively, were amplified by PCR and fused in frame to a firefly luciferase gene (*Luc*), essentially as described [25–27]. The resulting composite reading frame was inserted into the expression vector pIRESneo, generating the expression vectors pIRESneo-MCT8-Luc and pIRESneo-MCT10-Luc, respectively. The sequences were verified by DNA sequencing using a commercial service supplier (LGC Genomics GmbH, Berlin, Germany). HEK293 cells were transfected and stable cell clones expressing high levels of recombinant MCT8-Luc and MCT10-Luc fusion protein, respectively, were established by applying selection pressure via the antibiotic geneticin (G418). Stably transfected cells were expanded in DMEM supplemented with 10% FBS and used for the production of sufficient amounts of the fusion proteins needed for the analyses. Briefly, confluent cells were grown in 75 mm² dishes, harvested into PBS and lysed in resuspension buffer (20 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, and 10% glycerol). The suspension was cleared by centrifugation (2000× *g*, 5 min, 4 °C), the supernatant was collected, stored at –80 °C in aliquots, and thawed when needed for the measurements. Precipitation assays were established with the transporter fusion proteins, essentially as described previously [25–27].

2.4. Quantification of MCT8 and MCT10 Autoantibodies

Aliquots of the protein preparations (40 µl per reaction) were incubated with 10 µl of serum sample overnight at 4 °C. Immune complexes formed between the fusion proteins and endogenous immunoglobulins were then incubated with a protein A sepharose preparation (POROS-A, 10% (vol/vol), ASKA Biotech GmbH, Berlin) at room temperature for 1.5 h. Complexes were precipitated by centrifugation (500× *g*, 5 min, 4 °C), and pellets were washed three times with washing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100). Thereafter, luciferase activities were measured in a luminometer (Mitrax, Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, Germany), and results were recorded as relative light units (RLU). Binding indices (BI) were calculated as the ratio of the sample-specific signal observed in relation to the average of the bottom 50% of all signals, which was set at 1.0. Decision on positivity of a given signal was based on a mathematical outlier criterion using the full set of signals from the cohort of samples. To this end, the 75th percentile (P75) was determined, and 1.5-times the interquartile range (IQR) was added, yielding P75+1.5×IQR as threshold. This type of analysis was conducted for each of the three cohorts separately, as each cohort was analyzed at a different time and showed slightly different levels of background, potentially due to the pre-analytical histories of the samples tested.

2.5. Characterization of MCT8-aAb by Immunoprecipitation and Thyroid Hormone Uptake

Hemagglutinin (HA)-tagged MCT8 (MCT8-HA) expressing Madin-Darby Canine Kidney (MDCK-1) cells had been generated before [28], and protein extract was prepared as described above. MCT8-HA containing cell extract (100 μ l per reaction) was incubated with 50 μ l of serum and 15 μ l of protease inhibitor cocktail (cOmplete, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) overnight at 4 °C under constant agitation. The next day, samples were incubated with 100 μ l of protein A slurry for 1.5 h at room temperature, and immune complexes formed were pelleted by centrifugation at (500 \times g). Precipitated material was washed six times with PBS and resuspended in DTT-containing sample buffer. The complexes were dissolved by incubation at 90 °C for 2 min. Samples were centrifuged at 10,000 \times g for 15 min. Eluted proteins were subjected to electrophoresis in 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were probed overnight at 4°C with anti-HA antibody (ab9110, abcam, Cambridge, UK) in milk-containing incubation buffer. Membranes were washed three times with PBST, incubated with HRP-conjugated anti-rabbit antibody and milk buffer for 1 h, and washed three more times with PBST for 10 min. Resulting bands were visualized using an enhanced chemiluminescence Western blot detection kit. In order to test for biological activity of natural MCT8-aAb, positive and control serum samples (300 μ l each) were diluted with 300 μ l of PBS and incubated overnight under constant agitation at 4 °C with protein A sepharose slurry (300 μ l per reaction). Formed complexes were pelleted and washed six times with PBS. Bound immunoglobulins were eluted with 25 mM citric acid (pH 3.0) and pH was immediately adjusted to 7.0 using HEPES-NaOH (1M, pH 8.0). Eluted immunoglobulins were concentrated to 300 μ l (final protein concentration; 10 mg/ml) using Centricon Filters at 4 °C. Interfering effects of isolated immunoglobulins on TH uptake were tested with MDCK-1 cells expressing recombinant MCT8-HA. To this end, cells were incubated with ¹²⁵I-T4 (PerkinElmer Life LAS GmbH, Rodgau, Germany) and analyzed after different time periods, essentially as described [28].

2.6. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism v4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and SAS version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Data are presented as mean \pm SD or median with interquartile range (IQR) as indicated. Normal distribution was tested according to Shapiro–Wilk, and unpaired t-test was used to compare quantitative variables when normal distribution was given. Otherwise, data were compared by two-sided non-parametric U Mann–Whitney Test. Statistical significance is assigned as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$.

3. Results

3.1. Test for Linearity of the MCT8-aAb and MCT10-aAb Assays with Commercial Antibodies

One commercially available MCT8-specific and one MCT10-specific antiserum were selected to test the newly generated analytical assays for signal linearity. The signals obtained from the commercial antiserum samples in dilution experiments with human serum as matrix were correlating positively to the antibodies in the novel autoantibody tests with the MCT8-Luc-fusion protein (Figure 1A) and MCT10-Luc-fusion protein (Figure 1B), respectively. The linear range for analysis extended over at least one order of magnitude each, i.e., with an acceptable dynamics for the intended clinical analyses.

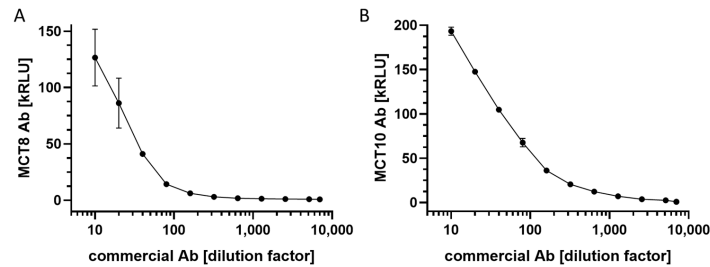


Figure 1. Characterization of the novel assays by a commercial anti-MCT8 or anti-MCT10 antiserum. (A) Dilution of the commercial MCT8-Ab with human serum yielded dose-dependent signals, indicating a suitable assay design and acceptable measuring range for clinical samples. (B) The commercial antiserum to human MCT10 was similarly suitable for testing the newly generated assay for detecting and quantifying MCT10-aAb in clinical samples. Measurements were conducted in duplicates, kRLU; 1000 relative light units.

3.2. Prevalence of aAb to MCT8 and MCT10 in Healthy Subjects

Serum samples from a cross-sectional collection of healthy human subjects ($n = 400$, 50% females) were analyzed by the MCT8-aAb and MCT10-aAb assays in parallel. The signals obtained showed a skewed distribution with some exceptionally high signals, indicating the presence of reactive aAb. Few slightly positive serum samples were identified by the MCT8-aAb assay (Figure 2A), and several strongly positive samples were found by the MCT10-aAb assay (Figure 2B). Using the outlier criterion of the 75th percentile plus 1.5-times the interquartile range ($P75+1.5 \times IQR$), a binding index of 2.01 defines the threshold for positivity. Applying this criterion, the prevalence in healthy subjects for MCT8-aAb was 3.8% (15 out of 400; 8 females and 7 males), and 4.5% for MCT10-aAb (18 out of 400; 8 females and 10 males), respectively, with the binding indices of positive signals for MCT10-aAb exceeding those for MCT8-aAb strongly (Figure 2A,B).

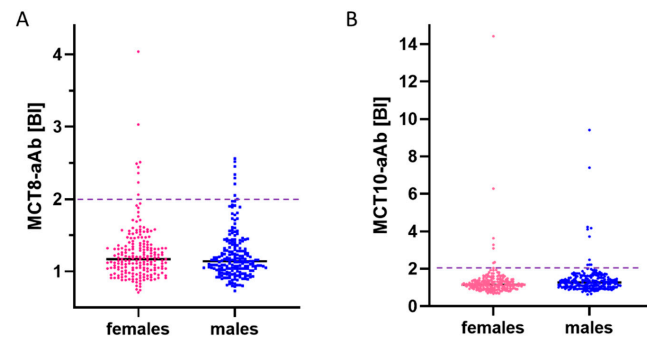


Figure 2. Prevalence of MCT8-aAb and MCT10-aAb in healthy control subjects. A cohort of healthy male and female subjects ($n = 200$ each) were tested in parallel for (A) MCT8-aAb, and (B) MCT10-aAb. Using the outlier criterion of the 75th percentile ($P75$) plus 1.5-times the inter quartile range ($P75+1.5 \times IQR$), a prevalence of 3.8% for MCT8-aAb, and 4.5% for MCT10-aAb was observed. No sex-specific difference was noted. The binding index (y-axis, factor above background) and the thresholds for positivity ($P75+1.5 \times IQR$ of all signals, broken horizontal lines) are indicated.

3.3. Prevalence of MCT8-aAb and MCT10-aAb in Overweight Young Subjects

Next, a cohort of healthy overweight adolescents ($n = 143$) participating in a weight reduction program (“MAINTAIN”) were analyzed. The signals obtained for both the MCT8-aAb and the MCT10-aAb were not normally distributed and showed again a skewed pattern (Figure 3A). A small number of samples was above the $P75+1.5 \times IQR$ threshold for MCT8-aAb and MCT10-aAb positivity, i.e., at a binding index greater than 2.66 ($BI > 2.66$). The number of positive signals for aAb to the two transporters was comparable, yielding a prevalence of 4.2% (6 out of 143) for MCT8-aAb, and 6.3% (9 out of 143) for MCT10-aAb, respectively. Three of the samples were positive for both MCT8-aAb and MCT10-aAb (Figure 3B). The two samples with the highest signals for MCT8-aAb (P1, P2) were selected for further testing on a potential functional role *in vitro*.

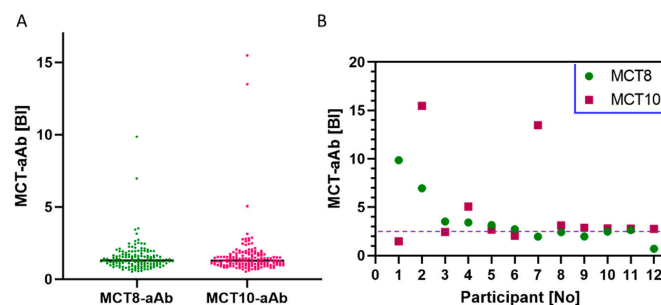


Figure 3. Prevalence of MCT8-aAb and MCT10-aAb in overweight adolescents. (A) A cohort of healthy adolescents ($n = 143$) participating in a weight reduction and maintenance program were analyzed in parallel for MCT8-aAb and MCT10-aAb. Using the outlier criterion of $P75+1.5 \times IQR$, a prevalence of 4.2% for MCT8-aAb and 6.3% for MCT10-aAb, respectively, was observed. (B) Overview on the individuals being positive for MCT8-aAb or MCT10-aAb, or both. The data indicate that some subjects expressed aAb recognizing both transporter proteins, likely due to the relatively high structural and sequence similarity of the antigens. The binding index (BI) is indicated along with the threshold for positivity (broken horizontal line). Green symbols; MCT8-aAb, red symbols; MCT10-aAb.

3.4. *In Vitro* Activity of MCT8-aAb Affecting TH Uptake Into Cells *In Vitro*

Three positive samples for MCT8-aAb from the cohort of overweight adolescents (P1–P3) along with four negative serum samples (C1–C4) were selected and tested for their interaction with recombinant MCT8 *in vitro* (Figure 4A). Two of the positive samples (P1, P2) along with three control samples were tested for their potential biological effects on TH uptake *in vitro* (Figure 4A). To this end, MDCK-cells expressing or not recombinant human HA-tagged MCT8 were grown and harvested. Cell homogenates were incubated with serum containing MCT8-aAb (P1–P3) or control serum (C1–C4). Antibody-protein complexes were precipitated with protein A, protein was eluted with glycine, applied to SDS-PAGE and blotted onto a nitrocellulose membrane. Recombinant MCT8 protein was detected via the fused HA-tag by HA-specific antibody (Figure 4A).

In order to test for interference with T4 uptake, MDCK-cells expressing recombinant MCT8 were plated and grown to confluency, MCT8-aAb positive or negative serum was added along with radioactively labeled TH (^{125}I -T4), and cells were harvested after different periods of time. The signals obtained (counts per minute, cpm) from the homogenates correspond to the degree of TH uptake and were significantly higher in the cells incubated with MCT8-aAb negative serum (controls, $n = 3$) as compared to cells incubated with MCT8-aAb positive (P1, P2) serum samples (Figure 4B).

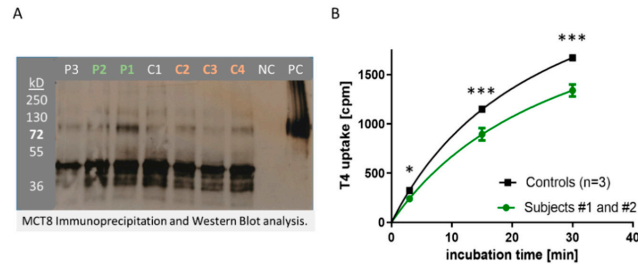


Figure 4. In vitro activity of MCT8-aAb. (A) Immunoprecipitation and Western blot analysis of recombinant human MCT8 by serum samples positive (P1–P3) or not (controls; C1–C4) for MCT8-aAb. The thick dark band in the lane far right presents the positive control (PC), i.e., an aliquot of recombinant MCT8 antigen as size marker and loading control. (B) Uptake of labeled T4 into MCT8-expressing MDCK-cells in the presence of control (black squares, $n = 3$) or MCT8-aAb positive serum (green dots, P1 and P2). The T4 uptake dynamics were similar, but the extent of uptake was diminished by the presence of immunoglobulins isolated from the MCT8-aAb positive sera. Comparison by two-sided non-parametric U Mann–Whitney Test; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

3.5. Prevalence of MCT8-aAb and MCT10-aAb in Thyroid Patients

Finally, the prevalence of MCT8-aAb and MCT10-aAb was determined in a cohort of adult thyroid patients. The signal distribution was similarly skewed as observed with the other two cohorts (Figure 5). Positive MCT8-aAb were found with a prevalence of 11.9% (38 out of 318), and MCT10-aAb with a prevalence of 6.3% (20 out of 317) in serum of thyroid patients (Figure 5A). Subdividing the full study group into different thyroid diseases, the prevalence of samples highly positive for MCT8-aAb was similar in the groups of Graves' disease ($n = 11$), Hashimoto's thyroiditis ($n = 12$) and other thyroid patients ($n = 15$) (Figure 5B). Similarly, there was no obvious difference in relation to MCT10-aAb, and patients with Graves' disease ($n = 6$), Hashimoto's thyroiditis ($n = 6$) or other thyroid disease ($n = 8$) showed a similar prevalence of MCT10-aAb (Figure 5B).

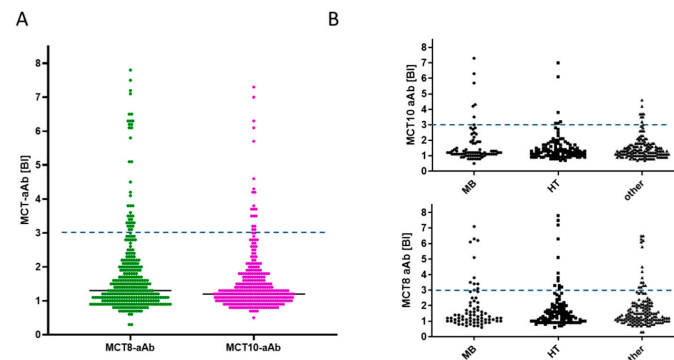


Figure 5. Prevalence of MCT8-aAb and MCT10-aAb in thyroid patients. (A) A cohort of adult patients with different thyroid diseases ($n = 318$) were analyzed for the presence of MCT8-aAb and MCT10-aAb, respectively. Several highly positive serum samples were identified, surpassing the diagnostic threshold. (B) Separating the patients according to their primary diagnosis into Graves' disease (MB), Hashimoto's thyroiditis (HT) and other thyroid diseases (other) indicated positive samples in all disease groups with no apparent disease-specific prevalence for MCT8-aAb or MCT10-aAb. The binding index (BI) is indicated along with the threshold for positivity (broken horizontal line), i.e., the value representing $P75+1.5 \times \text{IQR}$ of the full study cohort.

4. Discussion

In this explorative study, we present evidence that MCT8 and MCT10 are recognized as autoantigens in a subset of human subjects, and that MCT8-aAb and MCT10-aAb are similarly prevalent in obese adolescents and healthy adults. As we did not include a control group of non-obese adolescents, the influence of age and obesity on MCT8-aAb and MCT10-aAb prevalence remains unresolved. In thyroid patients, prevalence for both MCT8-aAb and MCT10-aAb was two- to three-fold higher than in healthy controls or adolescents, but still relatively low as compared to established thyroid autoantibodies. However, in this first analysis, no specific difference in relation to thyroid disease diagnosis was observed and no significant relation to any of the measured TH axis biomarkers (total T4, TSH) was detected. Both assays have been partially characterized with a specific commercial antiserum each, enabling an independent replication and comparison of these first results by other research teams interested in this issue. The *in vitro* experiment indicated that natural MCT8-aAb are capable of interfering with T4 uptake, suggesting a potential contribution of MCT8-aAb to the biological TH status and parameters of feedback regulation. However, the aAb detected in this study were of moderate concentrations only, and no obvious laboratory or clinical phenotype was associated with aAb positivity. As the nature of this pilot study was a cross-sectional setting with three small cohorts of samples, a potential role for disease predisposition or disease course cannot be deduced yet, and longitudinal analyses of larger cohorts of samples are needed next to identify a potential pathogenic relevance of MCT8-aAb or MCT10-aAb or both.

Nevertheless, the identification of specific MCT8-aAb and MCT10-aAb highlights that the TH transporters can be classified as novel autoantigens, thereby introducing another natural factor potentially affecting TH release and signaling. It is well established that individuals differ profoundly in their set-points of the TH axis [29], and their response to TH treatment [30]. Reference ranges are useful for detecting strong deviations of single subjects as compared to the majority in a given population, but do not faithfully replicate the individual TH status. Individual variations in e.g., serum TSH are in a more restricted concentration range as the boundaries of normal reference ranges would suggest. Molecular reasons for the differences in individual set-points of the TH axis are commonly explained by different genotypes and modifying effects of certain single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the centrally involved genes [31,32]. Accordingly, SNPs in the genes encoding the TRH-receptor (TRHR) [33], deiodinase type 1 or 2 [34,35], the TH transport molecules [10,36] or enzymes involved in TH metabolism have been described to affect peripheral TH status and individual set points [37]. Apart from stable SNPs and specific genotypes in the populations, a few inherited gene defects have highlighted the importance of particular genes in TH feedback control, causing variable degrees of resistance-to-TH (RTH), including the TH receptors alpha [38] or beta [39], the MCT8 [40] or an RNA-binding protein involved in deiodinase biosynthesis [41]. Besides these inborn differences in the genotypes of central components of the TH axis, epigenetic effects have likewise been put forward for explaining some variability in the TH axis, e.g., in relation to TRH [42], the TSH-receptor [43], TH receptor beta [44] or deiodinase type 3 [45]. In this manuscript, we highlight the notion that MCT8-aAb or MCT10-aAb may add another component to the observed variability of TH feedback regulation in a given population. A considerable fraction of healthy and especially of diseased subjects are positive for aAb to the most prominent TH transporters known to date, i.e., to MCT-8 and MCT-10, respectively, or to both in parallel. The aAb titers and specific binding characteristics constitute plausible parameters affecting TH feedback regulation and the individual TH set-points.

The identification of MCT8-aAb and MCT10-ab is not very surprising, as there is an increasing number of well-characterized examples of clinically relevant aAb to endocrine-relevant membrane proteins. Besides the already mentioned TSH-receptor, also the thyroid transporters for iodide, i.e., the sodium-iodide symporter (NIS) and pendrin, have been described as potential autoantigens of the TH axis, and reliable test systems have been developed [26,46]. Initially, strongly varying and particularly high prevalence has

been reported in thyroid patients, partly due to the usage of small peptides as bait molecules in the aAb assays. Subsequent studies using full-length proteins either by radioactive ligand binding [46] or via detection of antigen-reporter fusion proteins [26] indicated a similar and moderate prevalence, and in a range compatible to what is reported in this manuscript for MCT8-aAb and MCT10-aAb, respectively. Longitudinal studies for elucidating a potential role of such aAb for thyroid disease incidence are consistently lacking, but it is not unlikely that transporter-targeting aAb to iodide or TH uptake are eliciting biological activity in human subjects. The aAb may act alone or in combination and thereby contribute to the set-point of TH status and feedback regulation in a personalized way, thereby affecting the individual endocrine status of T3, T4 and TSH [47].

This notion is compatible to other membrane bound transport autoantigens known to be relevant for endocrine disease risk assessment and prediction, e.g., the zinc transporter ZnT8 in autoimmune diabetes mellitus [48,49]. Positive autoimmunity against ZnT8 is associated with an increased disease risk and high insulin requirement [50], and detection of ZnT8-aAb in siblings from affected children indicates an unfavorable prognosis [51]. Similarly, aAb recognizing transporters of the low-density-lipoprotein-receptor-related protein family (LPR) have been implicated in systemic autoimmune diseases, e.g., in rheumatoid arthritis [52]. Specific stimulating aAb to adrenergic receptors (AdrR) have been identified in Chagas' disease, i.e., in a most prevalent endemic autoimmune disease of the Americas [53]. However, detection of ADR-aAb is difficult, and routine tests for *in vitro* analysis are not yet available [54]. Convincing evidence has been obtained from bioassays, where the spontaneous rhythmic beating of cultured neonatal rodent cardiomyocytes is monitored and related to stimulating ADR-aAb [55]. Conversely, inhibiting ADR-aAb have been postulated in chronic fatigue syndrome, where they may impair adrenergic signaling [56], but a validation of the proposed diagnostic tests is missing.

Another prominent example for signal relevant aAb to a membrane ion channel is Myasthenia gravis, where aAb to the acetylcholine receptor are interfering with signal transduction at the neuromuscular junction [57]. Strong disease activity may suddenly occur, e.g., upon infection, potentially leading to an acute neurological emergency of respiratory failure and myasthenic crisis [58]. Fortunately, therapeutic measures have been improved, and disease severity can successfully be controlled by pharmacological intervention [59]. We have recently studied aAb to the IGF1-receptor (IGF1R), impairing IGF1 signaling [25], and related the presence of IGF1R-aAb to poor physical strength in young subjects [27]. Additional physiological effects are likely, given the broad relevance of IGF1 in development and disease. This notion is supported by the characterization of type B insulin resistance, where a high aAb load to the insulin receptor may constitute a life-threatening condition [60]. Fortunately, current therapeutic interventions are capable of controlling an overwhelming aAb burden with obviously long-term health benefits [61]. These findings are of general relevance to the TH axis, once subjects with exceedingly high levels and endocrine disrupting activities of MCT8-aAb or MCT10-aAb are identified. The novel assays for MCT8-aAb and MCT10-aAb will facilitate the identification and therapeutic control of such subjects with interfering natural autoimmunity to TH uptake.

5. Conclusions

We conclude that a subset of obese adolescents and adults express detectable amounts of MCT8-aAb or MCT10-aAb or both, which may affect the individual set point of the TH axis. The increased prevalence of MCT8-aAb and MCT10-aAb observed in thyroid patients points to a potential diagnostic relevance of the aAb, even though their presence was not associated with a particular form of thyroid disease, and very high concentrations were not observed in the small clinical cohorts analyzed. Nevertheless, such aAb may be present in certain subjects with unexplainable resistance to TH. The novel assays generated are capable of high throughput screening analyses, are highly robust and sensitive, and form a solid basis for expanding the analyses to large prospective epidemiological studies. These need to be conducted next, in parallel to more focused research on

subjects with rare patterns of TH status and TH-related phenotypes that may be caused by a non-genetic but autoimmune-related inhibition of TH transport.

Author Contributions: Conceptualization, L.S.; methodology, T.P., J.J., H.G., R.K., K.R. and W.B.M.; validation, H.G., R.K. and W.B.M.; formal analysis, T.P., S.M., P.K., S.W. and L.S.; resources, S.M., P.K., S.W. and L.S.; data curation, T.P. and L.S.; writing—original draft preparation, T.P. and L.S.; writing—review and editing, J.J., H.G., R.K., S.M., P.K., K.R., W.B.M. and S.W.; funding acquisition, S.W. and L.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Clinical Research Unit KFO-218 (“Hormonal regulation of body weight maintenance”), Research Unit FOR-2558 “TraceAge” (Scho 849/6-2), and CRC/TR 296 “Local control of TH action” (LocoTact, P17). We acknowledge support by the Open Access Publication Fund of Charité-Universitätsmedizin Berlin.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Charité-Universitätsmedizin, Berlin in 2009 and 2017, respectively (#EA2/015/09 and #EA2/173/17).

Informed Consent Statement: Written informed consent was obtained prior to the analyses from all subjects and/or one or both parent(s) of the adolescents enrolled in this study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to data safety reasons.

Acknowledgments: We thank Vartitèr Seher, Gabriele Boehm and Anja Fischbach for excellent technical support, and the colleagues from the CRC/TR 296 “Local control of TH action” for stimulating and motivating discussion.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest (except for the patent application).

References

- Bernal, J.; Guadaño-Ferraz, A.; Morte, B. Erratum: Thyroid hormone transporters—Functions and clinical implications. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2015**, *11*, 690, doi:10.1038/nrendo.2015.186.
- Schweizer, U.; Johannes, J.; Bayer, D.; Braun, D. Structure and Function of Thyroid Hormone Plasma Membrane Transporters. *Eur. Thyroid J.* **2014**, *3*, 143–153, doi:10.1159/000367858.
- Felmler, M.A.; Jones, R.S.; Rodriguez-Cruz, V.; Follman, K.E.; Morris, M.E. Monocarboxylate Transporters (SLC16): Function, Regulation, and Role in Health and Disease. *Pharmacol. Rev.* **2020**, *72*, 466–485, doi:10.1124/pr.119.018762.
- Friesema, E.C.; Grueters, A.; Biebermann, H.; Krude, H.; von Moers, A.; Reeser, M.; Barrett, T.G.; Svensson, J.; Kester, M.H.; et al. Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet* **2004**, *364*, 1435–1437, doi:10.1016/s0140-6736(04)17226-7.
- Dumitrescu, A.M.; Liao, X.-H.; Best, T.B.; Brockmann, K.; Refetoff, S. A Novel Syndrome Combining Thyroid and Neurological Abnormalities Is Associated with Mutations in a Monocarboxylate Transporter Gene. *Am. J. Hum. Genet.* **2004**, *74*, 168–175, doi:10.1086/380999.
- Schwartz, C.E.; Stevenson, R.E. The MCT8 thyroid hormone transporter and Allan–Herndon–Dudley syndrome. *Best Pr. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2007**, *21*, 307–321, doi:10.1016/j.beem.2007.03.009.
- Groeneweg, S.; Van Geest, F.S.; Abacı, A.; Alcántud, A.; Ambegaonkar, G.P.; Armour, C.M.; Bakhtiani, P.; Barca, D.; Bertini, E.S.; Van Beynum, I.M.; et al. Disease characteristics of MCT8 deficiency: An international, retrospective, multicentre cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2020**, *8*, 594–605, doi:10.1016/s2213-8587(20)30153-4.
- Grijota-Martínez, C.; Báñez-López, S.; Gómez-Andrés, D.; Guadaño-Ferraz, A. MCT8 Deficiency: The Road to Therapies for a Rare Disease. *Front. Neurosci.* **2020**, *14*, 380, doi:10.3389/fnins.2020.00380.
- Groeneweg, S.; Peeters, R.P.; Moran, C.; Stoupa, A.; Auriol, F.; Tonduti, D.; Dica, A.; Paone, L.; Rozenkova, K.; Malikova, J.; et al. Effectiveness and safety of the tri-iodothyronine analogue Triac in children and adults with MCT8 deficiency: An international, single-arm, open-label, phase 2 trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2019**, *7*, 695–706, doi:10.1016/s2213-8587(19)30155-x.
- Fu, J.; Korwutthikulrangsri, M.; Ramos-Platt, L.; Pierson, T.M.; Liao, X.-H.; Refetoff, S.; Weiss, R.E.; Dumitrescu, A.M. Sorting Variants of Unknown Significance Identified by Whole Exome Sequencing: Genetic and Laboratory Investigations of Two Novel MCT8 Variants. *Thyroid* **2020**, *30*, 463–465, doi:10.1089/thy.2018.0703.
- Braun, D.; Lelios, I.; Krause, G.; Schweizer, U. Histidines in Potential Substrate Recognition Sites Affect Thyroid Hormone Transport by Monocarboxylate Transporter 8 (MCT8). *Endocrinology* **2013**, *154*, 2553–2561, doi:10.1210/en.2012-2197.
- Morshed, S.A.; Davies, T.F. Graves’ Disease Mechanisms: The Role of Stimulating, Blocking, and Cleavage Region TSH Receptor Antibodies. *Horm. Metab. Res.* **2015**, *47*, 727–734, doi:10.1055/s-0035-1559633.

13. McLachlan, S.M.; 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*, 14–24, doi:10.1089/thy.2012.0374.
14. Goichot, B.; Leenhardt, L.; Massart, C.; Raverot, V.; Tramalloni, J.; Iraqi, H. Diagnostic procedure in suspected Graves' disease. *Ann. d'Endocrinologie* **2018**, *79*, 608–617, doi:10.1016/j.ando.2018.08.002.
15. Kahaly, G.J.; Diana, T. TSH Receptor Antibody Functionality and Nomenclature. *Front. Endocrinol.* **2017**, *8*, 28, doi:10.3389/fendo.2017.00028.
16. Marmouch, H.; Jenzri, H.; Ben Abdallah, B.; Tahri, S.; Charrada, I.; Khochtali, I. Obesity in Association of Autoimmune Thyroid Diseases and Type 2 Diabetes. *Metabolism* **2021**, *116*, 38–38, doi:10.1016/j.metabol.2020.154560.
17. Versini, M.; Jeandel, P.-Y.; Rosenthal, E.; Shoenfeld, Y. Obesity in autoimmune diseases: Not a passive bystander. *Autoimmun. Rev.* **2014**, *13*, 981–1000, doi:10.1016/j.autrev.2014.07.001.
18. Song, R.-H.; Wang, B.; Yao, Q.-M.; Li, Q.; Jia, X.; Zhang, J.-A. The Impact of Obesity on Thyroid Autoimmunity and Dysfunction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2349, doi:10.3389/fimmu.2019.02349.
19. Tsigalou, C.; Vallianou, N.; Dalamaga, M. Autoantibody Production in Obesity: Is There Evidence for a Link Between Obesity and Autoimmunity? *Curr. Obes. Rep.* **2020**, *9*, 245–254, doi:10.1007/s13679-020-00397-8.
20. Sanyal, D.; Raychaudhuri, M. Hypothyroidism and obesity: An intriguing link. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **2016**, *20*, 554–557, doi:10.4103/2230-8210.183454.
21. Zahedi, M.; Kazemian, E.; Ramezani-Tehrani, F.; Tohidi, M.; Azizi, F.; Khalili, D.; Rahmati, M.; Amouzegar, A. Assessment of the simultaneous effect of hypothyroidism and thyroid autoimmunity with gestational diabetes on the incidence of type 2 diabetes. *BMC Endocr. Disord.* **2020**, *20*, 1–8, doi:10.1186/s12902-020-00627-z.
22. Biondi, B.; Kahaly, G.J.; Robertson, R.P. Thyroid Dysfunction and Diabetes Mellitus: Two Closely Associated Disorders. *Endocr. Rev.* **2019**, *40*, 789–824, doi:10.1210/er.2018-00163.
23. Bau, A.-M.; Ernert, A.; Krude, H.; Wiegand, S. Hormonal regulatory mechanisms in obese children and adolescents after previous weight reduction with a lifestyle intervention: Maintain - paediatric part - a RCT from 2009-15. *BMC Obes.* **2016**, *3*, 29, doi:10.1186/s40608-016-0110-8.
24. Mehl, S.; Sun, Q.; Görlich, C.L.; Hackler, J.; Kopp, J.F.; Renko, K.; Mittag, J.; Schwerdtle, T.; Schomburg, L. Cross-sectional analysis of trace element status in thyroid disease. *J. Trace Elements Med. Biol.* **2020**, *58*, 126430, doi:10.1016/j.jtemb.2019.126430.
25. Minich, W.B.; Dehina, N.; Welsink, T.; Schwiebert, C.; Morgenthaler, N.G.; Köhrle, J.; Eckstein, A.; Schomburg, L. Autoantibodies to the IGF1 Receptor in Graves' Orbitopathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, 752–760, doi:10.1210/jc.2012-1771.
26. Eleftheriadou, A.-M.; Mehl, S.; Renko, K.; Kasim, R.H.; Schaefer, J.-A.; Minich, W.B.; Schomburg, L. Re-visiting autoimmunity to sodium-iodide symporter and pendrin in thyroid disease. *Eur. J. Endocrinol.* **2020**, *183*, 571–580, doi:10.1530/eje-20-0566.
27. Schwiebert, C.; Kühnen, P.; Becker, N.-P.; Welsink, T.; Keller, T.; Minich, W.B.; Wiegand, S.; Schomburg, L. Antagonistic Autoantibodies to Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Associate with Poor Physical Strength. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 463, doi:10.3390/ijms21020463.
28. Johannes, J.; Jayarama-Naidu, R.; Meyer, F.; Wirth, E.K.; Schweizer, U.; Schomburg, L.; Köhrle, J.; Renko, K. Silychristin, a Flavonolignan Derived from the Milk Thistle, Is a Potent Inhibitor of the Thyroid Hormone Transporter MCT8. *Endocrinology* **2016**, *157*, 1694–1701, doi:10.1210/en.2015-1933.
29. Andersen, S.; Bruun, N.H.; Pedersen, K.M.; Laurberg, P. Biologic Variation is Important for Interpretation of Thyroid Function Tests. *Thyroid* **2003**, *13*, 1069–1078, doi:10.1089/105072503770867237.
30. Hoermann, R.; Midgley, J.E.M.; Larisch, R.; Dietrich, J.W. Functional and Symptomatic Individuality in the Response to Levothyroxine Treatment. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 664, doi:10.3389/fendo.2019.00664.
31. Panicker, V. Genetics of Thyroid Function and Disease. *Clin. Biochem. Rev.* **2011**, *32*, 165–175.
32. Medici, M.; Visser, W.E.; Visser, T.J.; Peeters, R.P. Genetic Determination of the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis: Where Do We Stand? *Endocr. Rev.* **2015**, *36*, 214–244, doi:10.1210/er.2014-1081.
33. Brigante, G.; Spaggiari, G.; Santi, D.; Cioni, K.; Gnarini, V.; Diazzi, C.; Pignatti, E.; Casarini, L.; Marino, M.; Tuttmann, F.; et al. The TRHR Gene Is Associated with Hypothalamo-Pituitary Sensitivity to Levothyroxine. *Eur. Thyroid J.* **2014**, *3*, 101–108, doi:10.1159/000358590.
34. Kazukauskienė, N.; Skiriute, D.; Gustiene, O.; Burkauskas, J.; Zaliunaite, V.; Mickuviene, N.; Brozaitiene, J. Importance of Thyroid Hormone level and Genetic Variations in Deiodinases for Patients after Acute Myocardial Infarction: A Longitudinal Observational Study. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–13, doi:10.1038/s41598-020-66006-9.
35. Hoftijzer, H.C.; Heemstra, K.A.; Visser, T.J.; Le Cessie, S.; Peeters, R.P.; Corssmit, E.P.M.; Smit, J.W.A. The Type 2 Deiodinase ORFa-Gly3Asp Polymorphism (rs12885300) Influences the Set Point of the Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis in Patients Treated for Differentiated Thyroid Carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, 1527–1533, doi:10.1210/jc.2011-0235.
36. Van Der Deure, W.M.; Peeters, R.P.; Visser, T.J. Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters. *J. Mol. Endocrinol.* **2009**, *44*, 1–11, doi:10.1677/jme-09-0042.
37. Teumer, A.; Chaker, L.; Groeneweg, S.; Li, Y.; Di Munno, C.; Barbieri, C.; Schultheiss, U.T.; Traglia, M.; Ahluwalia, T.S.; Akiyama, M.; et al. Genome-wide analyses identify a role for SLC17A4 and AADAT in thyroid hormone regulation. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–14, doi:10.1038/s41467-018-06356-1.

38. Van Gucht, A.L.; Moran, C.; Meima, M.E.; Visser, W.E.; Chatterjee, K.; Visser, T.J.; Peeters, R.P. Resistance to Thyroid Hormone due to Heterozygous Mutations in Thyroid Hormone Receptor Alpha. *Curr. Top. Dev. Biol.* **2017**, *125*, 337–355, doi:10.1016/bs.ctdb.2017.02.001.
39. Fujisawa, H.; Gagné, J.; Dumitrescu, A.M.; Refetoff, S. Very Severe Resistance to Thyroid Hormone beta in One of Three Affected Members of a Family with a Novel Mutation in the THRB Gene. *Thyroid* **2019**, *29*, 1518–1520, doi:10.1089/thy.2019.0095.
40. Fu, J.; Dumitrescu, A.M. Inherited defects in thyroid hormone cell-membrane transport and metabolism. *Best Pr. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *28*, 189–201, doi:10.1016/j.beem.2013.05.014.
41. Dumitrescu, A.M.; Liao, X.-H.; Abdullah, M.S.Y.; Lado-Abel, J.; Majed, F.A.; Moeller, L.C.; Boran, G.; Schomburg, L.; Weiss, R.E.; Refetoff, S. Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism. *Nat. Genet.* **2005**, *37*, 1247–1252, doi:10.1038/ng1654.
42. Umezawa, R.; Yamada, M.; Horiguchi, K.; Ishii, S.; Hashimoto, K.; Okada, S.; Satoh, T.; Mori, M. Aberrant Histone Modifications at the Thyrotropin-Releasing Hormone Gene in Resistance to Thyroid Hormone: Analysis of F455S Mutant Thyroid Hormone Receptor. *Endocrinology* **2009**, *150*, 3425–3432, doi:10.1210/en.2008-1738.
43. Khan, M.S.; Pandith, A.A.; Masoodi, S.R.; Wani, K.A.; Hussain, M.U.; Mudassar, S. Epigenetic silencing of TSHR gene in thyroid cancer patients in relation to their BRAF V600E mutation status. *Endocrine* **2014**, *47*, 449–455, doi:10.1007/s12020-014-0319-6.
44. Ling, Y.; Shi, X.; Wang, Y.; Ling, X.; Li, Q. Down-regulation of thyroid hormone receptor beta1 gene expression in gastric cancer involves promoter methylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *444*, 147–152, doi:10.1016/j.bbrc.2014.01.012.
45. Hernandez, A.; Stohn, J.P. The Type 3 Deiodinase: Epigenetic Control of Brain Thyroid Hormone Action and Neurological Function. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1804, doi:10.3390/ijms19061804.
46. Brix, T.H.; Hegedüs, L.; Weetman, A.P.; Kemp, H.E. Pendrin and NIS antibodies are absent in healthy individuals and are rare in autoimmune thyroid disease: Evidence from a Danish twin study. *Clin. Endocrinol.* **2014**, *81*, 440–444, doi:10.1111/cen.12434.
47. Andersen, S.; Pedersen, K.M.; Bruun, N.H.; Laurberg, P. Narrow Individual Variations in Serum T4and T3in Normal Subjects: A Clue to the Understanding of Subclinical Thyroid Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2002**, *87*, 1068–1072, doi:10.1210/jcem.87.3.8165.
48. Sørgerød, E.P.; Skorpen, F.; Kvaløy, K.; Midthjell, K.; Grill, V. Prevalence of ZnT8 antibody in relation to phenotype andSLC30A8polymorphism in adult autoimmune diabetes. Results from the HUNT study, Norway. *Autoimmunity* **2012**, *46*, 74–79, doi:10.3109/08916934.2012.732132.
49. Achenbach, P.; Lampasona, V.; Landherr, U.; Koczwara, K.; Krause, S.; Grallert, H.; Winkler, C.; Pflüger, M.; Illig, T.; Bonifacio, E.; et al. Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLC30A8 genotype stratify type 1 diabetes risk. *Diabetologia* **2009**, *52*, 1881–1888, doi:10.1007/s00125-009-1438-0.
50. Kawasaki, E.; Nakamura, K.; Kuriya, G.; Satoh, T.; Kuwahara, H.; Kobayashi, M.; Abiru, N.; Yamasaki, H.; Eguchi, K. Autoantibodies to Insulin, Insulinoma-Associated Antigen-2, and Zinc Transporter 8 Improve the Prediction of Early Insulin Requirement in Adult-Onset Autoimmune Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2010**, *95*, 707–713, doi:10.1210/jc.2009-1733.
51. Burke, G.W., 3rd; Vendrame, F.; Viridi, S.K.; Ciancio, G.; Chen, L.; Ruiz, P.; Messinger, S.; Reijonen, H.K.; Pugliese, A. Lessons From Pancreas Transplantation in Type 1 Diabetes: Recurrence of Islet Autoimmunity. *Curr. Diabetes Rep.* **2015**, *15*, 121, doi:10.1007/s11892-015-0691-5.
52. Ooka, S.; Matsui, T.; Nishioka, K.; Kato, T. Autoantibodies to low-density-lipoprotein-receptor-related protein 2 (LRP2) in systemic autoimmune diseases. *Arthritis Res.* **2003**, *5*, R174–R180.
53. Wallukat, G.; Saravia, S.G.M.; Haberland, A.; Bartel, S.; Araujo, R.; Valda, G.; Duchon, D.; Ramirez, I.D.; Borges, A.C.; Schimke, I. Distinct Patterns of Autoantibodies Against G-Protein-Coupled Receptors in Chagas' Cardiomyopathy and Megacolon. Their potential impact for early risk assessment in asymptomatic Chagas' patients. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2010**, *55*, 463–468, doi:10.1016/j.jacc.2009.06.064.
54. Boege, F.; Westendorf, R.; Jahns, R. beta1AAb Determined by Peptide ELISA: A Signal in the Noise? *J. Am. Coll. Cardiol.* **2017**, *70*, 807–808, doi:10.1016/j.jacc.2017.03.617.
55. Wallukat, G.; Wenzel, K.; Schimke, I. Analytics of Functional Autoantibodies in Patients with Chagas Disease. *Methods Mol. Biol.* **2019**, *1955*, 247–261, doi:10.1007/978-1-4939-9148-8_19.
56. Loebel, M.; Grabowski, P.; Heidecke, H.; Bauer, S.; Hanitsch, L.G.; Wittke, K.; Meisel, C.; Reinke, P.; Volk, H.-D.; Fluge, Ø.; et al. Antibodies to beta adrenergic and muscarinic cholinergic receptors in patients with Chronic Fatigue Syndrome. *Brain Behav. Immun.* **2016**, *52*, 32–39, doi:10.1016/j.bbi.2015.09.013.
57. Hara, H.; Hayashi, K.; Ohta, K.; Itoh, N.; Nishitani, H.; Ohta, M. Detection and characterization of blocking-type anti-acetylcholine receptor antibodies in sera from patients with myasthenia gravis. *Clin. Chem.* **1993**, *39*, 2053–2057.
58. Roper, J.; Fleming, M.E.; Long, B.; Koefman, A. Myasthenia Gravis and Crisis: Evaluation and Management in the Emergency Department. *J. Emerg. Med.* **2017**, *53*, 843–853, doi:10.1016/j.jemermed.2017.06.009.
59. Ciafaloni, E. Myasthenia Gravis and Congenital Myasthenic Syndromes. *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* **2019**, *25*, 1767–1784, doi:10.1212/con.0000000000000800.
60. Lupsa, B.C.; Chong, A.Y.; Cochran, E.K.; Soos, M.A.; Semple, R.K.; Gorden, P. Autoimmune Forms of Hypoglycemia. *Medicine* **2009**, *88*, 141–153, doi:10.1097/md.0b013e3181a5b42e.
61. Censi, S.; Mian, C.; Betterle, C. Insulin autoimmune syndrome: From diagnosis to clinical management. *Ann. Transl. Med.* **2018**, *6*, 335, doi:10.21037/atm.2018.07.32.

8. Lebenslauf

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

9. Publikationsliste

Natural Autoimmunity to the Thyroid Hormone Monocarboxylate Transporters MCT8 and MCT10

Theresa Porst¹, Jörg Johannes¹, Hans Gluschke¹, Richard Köhler¹, Sebastian Mehl¹, Peter Kühnen², Kostja Renko¹, Waldemar B. Minich¹, Susanna Wiegand² and Lutz Schomburg¹.

¹ Institute for Experimental Endocrinology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt Universität zu Berlin, D-10115 Berlin, Germany

² Department of Paediatric Endocrinology and Diabetology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt Universität zu Berlin, D-13353 Berlin, Germany

Academic Editors: Marek Drozdziak and Jun Lu

Biomedicines **2021**, *9*(5), 496;

Received: 27 March 2021 / Revised: 24 April 2021 / Accepted: 29 April 2021 / Published: 30 April 2021

Impact Factor: 4,717

10. Patent

Biomarker für endokrine, autoimmun-bezogene Funktionsstörung

German Patent DE102017204268

Inventors:

SCHOMBURG LUTZ (DE)

JOHANNES JÖRG (DE)

PORST THERESA (DE)

Application Number: DE102017204268A

Publication Date: 09/20/2018

Filing Date: 03/14/2017

11. Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Lutz Schomburg gilt mein größter Dank. Er hat mich zunächst als exzellenter Hochschullehrer und Didaktiker begeistert: Knut, der Eisbär, der an einer autoimmunen Enzephalitis gestorben ist, wird mir immer in Erinnerung bleiben. Mit der Aufnahme in seine Arbeitsgruppe ermöglichte er mir den Zugang zu einem traumhaften Labor und damit das Erlernen gänzlich neuer Methoden. Er stand dabei stets mit wertvollem Rat an meiner Seite, hatte immer ein offenes Ohr und war in der Lage, sowohl Höhepunkte zu feiern, als auch über Tiefpunkte hinwegzuhelfen. Seine Begeisterung für die Endokrinologie und die Forschung und seine Fähigkeit, komplexe Zusammenhänge verständlich zu machen, werden mir stets als Inspiration dienen. Für seine unermüdliche Unterstützung möchte ich mich bedanken und besonders dafür, dass mein Kindheitstraum eines Patents Wirklichkeit wurde.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Mentor Dr. Jörg Johannes, der mir alles beibrachte und ohne dessen Mitarbeit dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Für die Unterstützung im Labor möchte ich mich stellvertretend bei Dr. Waldemar Minich, Dr. Niels-Peter Becker, Dr. Kosja Renko und Dr. Eddy Rijntjes bedanken. Desweiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeiter*innen des Instituts für Experimentelle Endokrinologie für den wissenschaftlichen Input und die immerwährende Möglichkeit Fragen zu stellen sowie für die technische Hilfe bedanken. Danke Euch allen für die gute Atmosphäre, die tollen Feiern und dass ich mich immer willkommen gefühlt habe!

Bei Prof. Dr. Köhrle möchte ich mich für seine ansteckende Begeisterung für Schilddrüsenhormone und die interessanten wissenschaftlichen Diskurse bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt unseren Kooperationspartner*innen und den Patient*innen, die sich für wissenschaftliche Studien zur Verfügung stellen.

Ich möchte mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und Motivation bedanken! Bei meinen Eltern, die mir nicht nur dieses Studium ermöglicht haben, sondern mich seitdem ich denken kann motiviert und unterstützt haben. Danke für das Selbstvertrauen, das Ihr mir geschenkt habt! Insbesondere möchte ich mich bei meiner Mutter Elisabeth bedanken, die für ihre Kinder auf Ihr Medizinstudium verzichtet hat und heute dennoch in der Lage ist, diese Arbeit mit mir zu diskutieren! Die Begeisterung für Hormone habe ich von Dir, Danke!