

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Zentrum der Inneren Medizin
Medizinische Klinik I: Gastroenterologie und Hepatologie, Pneumologie
und Allergologie, Endokrinologie und Diabetologie sowie
Ernährungsmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. S. Zeuzem

**Genvarianten der Immunregulation
bei den Autoimmunopathien Hashimoto-Thyreoditis,
Morbus Basedow und Morbus Addison**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Inka Elisabeth Robbers
aus Freiburg im Breisgau

Frankfurt am Main, 2011

Dekan: Prof. Dr. med. Josef Pfeilschifter
Referent: Prof. Dr. med. Klaus Badenhoop
Korreferent: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Erhard Seifried

Tag der mündlichen Prüfung: 29.03.2012

Zusammenfassung

Ein charakteristisches Merkmal von Autoimmunerkrankungen ist der selektive Angriff des Immunsystems auf einen einzigen Zelltyp, ein Organ oder Gewebe durch bestimmte T- und B-Lymphozyten. Die genaue Ursache von Autoimmunerkrankungen bleibt bislang ungeklärt, jedoch scheint eine bestimmte genetische Konstellation bei Zusammentreffen mit im weitesten Sinne umweltbedingten Faktoren die Reaktionen zu erklären. Zu solchen umweltbedingten Faktoren gehören auch Infektionen. Häufig werden Assoziationen zwischen Infektion und autoimmuner Erkrankung beobachtet. Auch kann bei einer akuten Infektion ein vorhandener Autoimmunprozess exazerbieren. Eine schnelle Verteidigung gegen Infektionen gewährleistet das angeborene Immunsystem, bevor das adaptive Immunsystem zum Tragen kommt. Die Moleküle, die bei diesen Abwehrprozessen frei werden, können zur T-Zell-Vermehrung führen, die einerseits eine effektive Selbstverteidigung möglich macht; andererseits können sie aber auch die Vermehrung autoreaktiver T-Zellen zur Folge haben. An frühen Vorgängen nach dem Kontakt mit einem Pathogen ist eine Vielzahl von Zyto- und Chemokinen beteiligt. Typ-1-Interferone (IFN1) sind ebensolche Zytokine, die vor allem in der Abwehr gegen Viren eine Rolle spielen und in mehrschrittigen Prozessen auch zur Aktivierung von T- und B-Zellen führen. IFIH1 ist ein intrazellulärer Rezeptor, der dsRNA im Zytosol detektiert und in der Folge die Transkription von IFN1 aktiviert. Veränderungen im Gen dieses Rezeptors zeigen Assoziationen zu Typ-1-Diabetes (T1D) und bieten einen funktionellen Berührungspunkt zwischen früher Infektabwehr durch das angeborene Immunsystem und der letztlich gewebeszerstörerischen T- und B-Zell-Reaktion. In dieser Arbeit wurde daher die Assoziation dreier endokriner Autoimmunopathien mit dem IFIH1-Polymorphismus rs1990760 durchgeführt, der in der Literatur als deutlich assoziiert mit T1D beschrieben wird. Mit Hashimoto-Thyreoditis, Morbus Basedow und Morbus Addison wurden Krankheiten gewählt, die im genetischen Hintergrund viele Gemeinsamkeiten untereinander und mit T1D aufweisen.

Zusammenfassung

Durch die in der Literatur beschriebenen Assoziationen mit T1D rückt nun der IFIH1-rs1990760 Polymorphismus potentiell auch in das genetische Anfälligkeitsprofil dieser endokrinen Autoimmunopathien. Für die Assoziationsanalyse wurde in dieser Arbeit DNA von betroffenen Individuen und gesunden Kontrollen mittels RT-PCR auf den IFIH1-Polymorphismus rs1990760 (Allele „A“/„G“) typisiert und die Genotyp- und Allelhäufigkeiten verglichen. Außerdem wurden Familienanalysen durchgeführt und die Transmission der Allele auf Unterschiede im Vererbungsverhalten hin untersucht. Es konnten keine statistisch relevanten Assoziationen zwischen dem IFIH1-Polymorphismus rs1990760 und Hashimoto-Thyreoiditis, Morbus Basedow und Morbus Addison gefunden werden. Weiterhin wurden Subgruppen gebildet, um eventuell in der Gesamtgruppe nicht erkennbare Trends aufzudecken. Für Hashimoto-Thyreoiditis und Morbus Basedow wurde der HLA-Typ DQ2 als Risikotyp angenommen, für Morbus Addison der Typ HLA-DQ2/DQ8. Der Antikörperstatus der untersuchten Individuen wurde ebenfalls in die Untersuchung einbezogen. In der Familienanalyse mit an Hashimoto-Thyreoiditis erkranktem Kind wurden Subgruppen gebildet, die den TPO-Ak und Tg-Ak-Status der Eltern berücksichtigen. Bei Morbus Basedow wurde der TSH-R-Antikörper bei der Fall-Kontroll-Analyse zur Subgruppenbildung herangezogen. Wenn sich auch keine statistisch eindeutigen Assoziationen nachweisen ließen, so waren bei Hashimoto-Thyreoiditis und Morbus Basedow in einigen Subgruppen doch Tendenzen zu erkennen, die eine Beteiligung des Polymorphismus an der genetischen Anfälligkeit vermuten lassen könnten. Die beobachteten Trends deuten darauf hin, dass in bestimmten Patientengruppen der untersuchte Polymorphismus eine Rolle in der Anfälligkeit spielen könnte.

Abstract

The selective targeting of a single cell type, organ or tissue by a certain population of autoreactive T- and B-cells is a characteristic feature of autoimmune diseases. This autoaggressive immune reaction leads to chronic inflammation, tissue destruction and subsequently to malfunction of the corresponding organ. The exact cause of autoimmune diseases still remains unclear, but there is strong evidence that most autoimmune diseases are linked to certain specific genes. Environmental triggers that encounter eligible genetic conditions are able to activate the autoimmune reactions. Infections rank among such environmental triggers. Associations between infections and autoimmune disease as well as exacerbation of ongoing autoimmune processes due to acute infection can be found frequently. The innate immune system enables the organism to rapid antimicrobial and antiviral defense, prior to the specific responses of adaptive immunity. Liberated molecules in early host defense of innate immunity can amplify protective T-cells. On the other hand proliferation of autoreactive T-cells might result. A variety of cyto- and chemokines is involved in the pathways of rapid innate immune reaction. Type-1-IFNs are such cytokines, which primarily play a role in establishing an antiviral state. Downstream effects are also the activation of T-and-B-cell depending processes. IFIH1 is one intracellular receptor among others that leads to production of IFN. It detects dsRNA in the cytosol and subsequently activates the transcription of type-1-IFN. SNPs in the IFIH1-gene show associations with T1D and provide a functional link between early host defense by innate immunity and destructive autoaggressive tissue damage by T- or B-cell-response.

In this study, an association-analysis of three endocrine autoimmune diseases with the IFIH1-polymorphism rs1990760 has been carried out. Hashimoto-Thyroiditis, Graves' disease and Addison's disease were selected as their genetic profile shows many similarities among each other and with type 1 diabetes (T1D). The fact that associations with T1D and the IFIH1-rs1990760

Abstract

polymorphism are described in literature points IFIH1 out as a candidate for associations with other autoimmune diseases.

DNA of affected individuals has been genotyped for the IFIH1-rs199760 polymorphism „A/G“ by RT-PCR. Genotype- and allele-frequencies have been compared to those in healthy controls. Further family-studies of Hashimoto- and Basedow-families have been carried out.

No significant differences were found between the allele and genotype frequencies for rs1990769 polymorphism in patients with Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease, Addison's disease and healthy controls. Furthermore, the interaction between rs1990760 polymorphism with human leukocyte antigen risk haplotype DQ2, the risk haplotypes DQ2/DQ8 and the status of thyroglobulin antibody, thyroid peroxidase antibody and TSH receptor antibody in patients and families were analysed. In some of the subgroups of Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease trends were revealed, that suggest the IFIH1 polymorphism rs1990760 to play a role in the pathogenesis of those diseases. Thus, further investigations with larger study populations are needed to make definitive statements about associations between Hashimoto's-Thyroiditis, Graves' disease and Addison's disease and the IFIH1-polymorphism rs1990760.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abstract.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abbildungsverzeichnis.....	XIII
Abkürzungsverzeichnis.....	XIV
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Immunsystem.....	1
1.1.1 Das angeborene Immunsystem.....	1
1.1.1.1 Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems.....	2
1.1.2 Pathogen assoziierte molekulare Muster und Mustererkennungsrezeptoren.....	3
1.1.3 RIG-ähnliche-Rezeptoren	4
1.1.3.1 Struktur und Liganden	4
1.1.3.2 RLR-vermittelte Signaltransduktion	5
1.1.4 Das Typ-1-Interferon-System.....	7
1.1.4.1 Typ-1-Interferon und Signalwege.....	8
1.1.5 Das adaptive Immunsystem.....	9
1.1.5.1 Adaptives Immunsystem und Selbst-Toleranz.....	10
1.1.5.2 Zentrale Toleranz von T- und B-Zellen.....	10
1.1.5.3 Periphere Toleranz.....	11
1.2 Autoimmunität.....	11
1.2.1 Virale Infektionen und Autoimmunität.....	16
1.3 Endokrine Autoimmunopathien.....	18
1.3.1 Hashimoto-Thyreoditis.....	18
1.3.2 Morbus Basedow.....	21
1.3.3 Morbus Addison.....	24
1.4 Fragestellung.....	27
2 Material und Methoden.....	28

Inhaltsverzeichnis

2.1 Patienten, Familien und Kontrollpersonen.....	28
2.2 Untersuchung auf IFIH1-Polymorphismus rs1990760.....	29
2.3 Materialien.....	30
2.3.1 Geräte, Gefäße und Zubehör.....	30
2.3.2 Chemikalien.....	31
2.3.3 Puffer und Lösungen.....	32
2.3.4 Sonden.....	34
2.3.5 Software.....	34
2.4 Methoden.....	35
2.4.1 DNA-Isolierung mit der Aussalzmethode.....	35
2.4.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	36
2.4.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	36
2.4.4 HLA-Typisierung durch PCR mit Sequenz-spezifischen Primern.....	38
2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	42
2.4.6 Real-Time-PCR	44
2.4.7 Genotypisierung von Single-Nucleotide-Polymorphismen (SNPs) mit dem RT- PCR-Verfahren.....	44
2.4.8 Bestimmung der Thyreoperoxidase-, Thyreoglobulin- und TSH- Rezeptor-Antikörper	45
2.4.9 Indirekte Haplotypisierung.....	46
2.4.10 Konditionierung und Subgruppenbildung.....	47
2.5 Mathematische Methoden zur statistischen Auswertung.....	48
2.5.1 Genfrequenz.....	48
2.5.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	49
2.5.3 χ^2 -Vierfeldertest.....	51
2.5.4 Transmission-Disequilibrium-Test (TDT).....	51
2.5.5 Odds Ratio (OR).....	52
3 Ergebnisse.....	54
3.1 Überblick über die durchgeführten Untersuchungen.....	54
3.2 Hashimoto-Thyreoditis.....	55

Inhaltsverzeichnis

3.2.1 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Hashimoto-Patienten und gesunden Kontrollen.....	55
3.2.2 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Hashimoto-Thyreoditis im Zusammenhang mit dem HLA-Risiko.....	56
3.2.3 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei männlichen und weiblichen Individuen	57
3.2.4 IFIH1-Polymorphismus rs1990760, Hashimoto-Thyreoditis und Antikörperstatus (TPO-Ak und Tg-Ak).....	59
3.3 Hashimoto-Familienanalysen.....	61
3.3.1 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 und HLA-Risiko der Eltern.....	63
3.3.2 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Hashimoto-Familien und elterlicher Antikörperstatus (TPO-Ak und Tg-Ak).....	65
3.4 Morbus Basedow.....	67
3.4.1 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Morbus Basedow-Patienten und gesunden Kontrollen.....	67
3.4.2 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Morbus Basedow im Zusammenhang mit dem HLA-Risiko.....	68
3.4.3 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei männlichen und weiblichen Individuen	69
3.4.4 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Morbus Basedow und TSH- Rezeptor-Antikörper	71
3.5 Basedow-Familienanalysen.....	73
3.5.1 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Basedow-Familien und HLA- Risiko der Eltern.....	74
3.6 Morbus Addison.....	77
3.6.1 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Morbus Addison im Zusammenhang mit dem HLA-Risiko.....	78
3.6.2 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Morbus Addison bei männlichen und weiblichen Individuen	80
4 Diskussion.....	85
4.1 Hashimoto-Thyreoditis und der IFIH1-Polymorphismus rs1990760.....	88

Inhaltsverzeichnis

4.2 Morbus Basedow und der IFIH1-Polymorphismus rs1990760.....	92
4.3 Morbus Addison und der IFIH1-Polymorphismus rs1990760.....	95
4.4 Fazit und Ausblick.....	97
5 Literaturverzeichnis.....	98
6 Anhang.....	124
6.1 Danksagung.....	124
6.2 Lebenslauf.....	125
6.3 Ehrenwörtliche Erklärung.....	126

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anfälligkeitsgene für endokrine Immunopathien mit angenommener Rolle im Pathomechanismus.....	13
Tabelle 2: Patienten und Kontrollen - Herkunft, Alter und Anzahl.....	28
Tabelle 3: Familien - Herkunft, Alter und Anzahl.....	29
Tabelle 4: Reaktionsgemisch und -bedingungen der PCR-SSP.....	42
Tabelle 5: Pipettieransatz für die RT-PCR.....	45
Tabelle 6: Exemplarische Darstellung der Genfrequenzberechnung.....	49
Tabelle 7: Kombinationsquadrat für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	50
Tabelle 8: Exemplarische Darstellung der Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts.....	50
Tabelle 9: Exemplarische Darstellung des TDT.....	52
Tabelle 10: Exemplarische Darstellung der Berechnung der OR.....	53
Tabelle 11: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Patienten mit Hashimoto-Thyreoditis gegenüber Kontrollen.....	55
Tabelle 12: Allelfrequenzanalyse des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Patienten mit Hashimoto-Thyreoditis und Kontrollen.....	55
Tabelle 13: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen bei Patienten mit Hashimoto-Thyreoditis gegenüber Kontrollen.....	56
Tabelle 14: Allelfrequenzanalyse des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 im Zusammenhang mit HLA-Allelen bei Patienten gegenüber Kontrollen. .	57
Tabelle 15: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen und dem Geschlecht bei Patienten mit Hashimoto-Thyreoditis gegenüber Kontrollen.....	58
Tabelle 16: Allelfrequenzanalyse des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen und dem Geschlecht bei Patienten mit Hashimoto-Thyreoditis gegenüber Kontrollen.....	59
Tabelle 17: Genotypenverteilung bei Antikörper-positiven Hashimoto-Patienten gegenüber Kontrollen.....	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 18: Allelverteilung bei Antikörper-positiven Hashimoto-Patienten gegenüber Kontrollen.....	60
Tabelle 19: Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Hashimoto-Familien.....	61
Tabelle 20: Mütterliche Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Hashimoto-Familien.....	62
Tabelle 21: Väterliche Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Hashimoto-Familien.....	62
Tabelle 22: Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Hashimoto-Familien in Zusammenhang mit HLA-Allelen.....	63
Tabelle 23: Mütterliche Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Hashimoto-Familien in Zusammenhang mit HLA-Allelen.....	64
Tabelle 24: Väterliche Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Hashimoto-Familien in Zusammenhang mit HLA-Allelen.....	64
Tabelle 25: Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Hashimoto-Familien in Zusammenhang mit dem Antikörperstatus der Eltern.....	66
Tabelle 26: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Patienten mit Morbus Basedow gegenüber Kontrollen.....	67
Tabelle 27: Allelfrequenzanalyse des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Patienten mit Morbus Basedow gegenüber Kontrollen.....	67
Tabelle 28: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen bei Patienten mit Morbus Basedow gegenüber Kontrollen.....	68
Tabelle 29: Allelfrequenzanalyse des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen bei Patienten mit Morbus Basedow gegenüber Kontrollen.....	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 30: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen und dem Geschlecht bei Patienten mit Morbus Basedow gegenüber Kontrollen.....	70
Tabelle 31: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen und Geschlecht bei Patienten mit Morbus Basedow gegenüber Kontrollen.....	71
Tabelle 32: Genotypenverteilung bei Antikörper-positiven Morbus Basedow-Patienten gegenüber Kontrollen.....	72
Tabelle 33: Allelverteilung bei Antikörper-positiven Morbus Basedow-Patienten gegenüber Kontrollen.....	72
Tabelle 34: Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Basedow-Familien.....	73
Tabelle 35: Mütterliche Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Basedow-Familien.....	74
Tabelle 36: Väterliche Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Basedow-Familien.....	74
Tabelle 37: Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Basedow-Familien in Zusammenhang mit HLA-Allelen...	75
Tabelle 38: Mütterliche Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Basedow-Familien in Zusammenhang mit HLA-Allelen.....	75
Tabelle 39: Väterliche Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Basedow-Familien in Zusammenhang mit HLA-Allelen.....	76
Tabelle 40: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Patienten mit Morbus Addison gegenüber Kontrollen.....	77
Tabelle 41: Allelfrequenzanalyse des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Patienten mit Morbus Addison gegenüber Kontrollen.....	77
Tabelle 42: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen bei Patienten mit Morbus Addison gegenüber Kontrollen.....	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 43: Allelfrequenzanalyse des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen bei Patienten mit Morbus Addison gegenüber Kontrollen.....	80
Tabelle 44: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen und Geschlecht bei Patientinnen mit Morbus Addison gegenüber weiblichen Kontrollen.....	81
Tabelle 45: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen und Geschlecht bei männlichen Patienten mit Morbus Addison gegenüber männlichen Kontrollen.....	82
Tabelle 46: Allelfrequenzanalyse des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen und Geschlecht bei Patientinnen mit Morbus Addison gegenüber weiblichen Kontrollen.....	83
Tabelle 47: Allelfrequenzanalyse des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen und Geschlecht bei männlichen Patienten mit Morbus Addison gegenüber männlichen Kontrollen.....	84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rig-ähnliche Rezeptoren.....	5
Abbildung 2: IFIH1-Signalkaskade und Interferon-Signalweg.....	6
Abbildung 3: Temperaturschema der RT-PCR.....	45
Abbildung 4: Indirekte Haplotypisierung.....	47

Abkürzungsverzeichnis

In dieser Arbeit verwendete Abkürzungen stehen oft für die international gebräuchlichen englischen Begriffe. Wo sich die deutschen Begriffe nicht aus den Abkürzungen ableiten lassen, folgen die eher gebräuchlichen englischen Bezeichnungen in Klammern.

°C	Grad Celsius
ACA	Adrenal-Cortex Autoantikörper
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
AIDS	Erworbene Immundefizienz (Acquired Immune Deficiency Syndrome)
AIRE	Autoimmunregulator
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APECED	Autoimmune-Polyendocrinopathie-Candidiasis-Ektodermale-Dystrophie
APS	Autoimmunes polyglanduläres Syndrom
BCR	B-Zell-Rezeptor (B-Cell-Receptor)
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)
CA	Kalifornien (California)
CARD	Caspase-Rekrutierende-Domäne
Cardif	CARD- Adaptor induzierendes Interferon- β
CD	Differenzierungsgruppe (Cluster of Differentiation)
CED	Chronisch Entzündliche Darmerkrankung
CI	Konfidenzintervall (Confidence Interval)
CMV	Cytomegalievirus
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor (Colony-Stimulating Factor)
CTLA	Zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen (Cytotoxic T-Lymphocyte-Antigen)
CXCL	Chemokin-Ligand

Abkürzungsverzeichnis

D	Deutschland
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic-acid)
dNTPs	Desoxy-Nukleotid-Triphosphate
ds	Doppelsträngig
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
ft3	Freies Trijodthyronin
ft4	Freies Tetrajodthyronin (Thyroxin)
HCL	Salzsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HTLV	Humanes T-lymphotropes Virus
IFIH	Interferon-induzierte Helicase
IFN	Interferon
IFNR	Interferon-Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IKK ϵ	Inhibitorischer kB-Kinase-Komplex ϵ
IL	Interleukin
IN	Indiana
IPS	Interferon-Promotor-Stimulationsprotein
IRF	Interferon-regulierender Faktor
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
ISGF	Interferon-stimulierter-Gen-Faktor
ISRE	Interferon-stimuliertes Antwortelement (Interferon-Stimulated Response Element)
JAK	Janus-Kinase

Abkürzungsverzeichnis

kb	Kilobase
L-Thyroxin	Levo-Thyroxin
LGP2	Labor für Genetik und Physiologie 2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2)
MA	Massachusetts
MAVS	Mitochondriales antiviral signalisierendes Protein
MDA5	Melanom assoziiertes Differenzierungs-Gen-5 (Melanoma Differentiation Associated Gene-5)
Min.	Minute
MS	Multiple Sklerose
NF- κ B	Nuclearer Faktor κ -B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NL	Niederlande
NT	Nicht-Transmission
NV	Nevada
OH	Ohio
OR	Odds Ratio
PA	Pennsylvania
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulares Muster (Pathogen Associated Molecular Pattern)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
pDC	Plasmacytoide Dendritische Zelle
PKR	DsRNA-abhängige Serin/Threonin-Protein-Kinase (Protein-Kinase R)
PRR	Mustererkennender Rezeptor (Pattern-Recognition-Rezeptor)
PTPN22	Protein-Tyrosin Phosphatase, Nonrezeptor-Typ 22
RIG-1	Protein des Retinsäure-induzierten Gens-1 (Retinoic-Acid-Inducible Gene-1)
RLR	Rig-ähnlicher Rezeptor (Rig-Like-Receptor)
RNA	Ribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

RNase L	Ribonuclease L
RT-PCR	Echtzeitpolymerase-Kettenreaktion (Real-Time Polymerase Chain Reaction)
S	Schweden
SCC	Seitenkettenschneidenzym (Side-Chain-Cleavage Enzyme)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SNP	Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (Single Nucleotide Polymorphism)
ss	Einzelsträngig (single stranded)
ssDNA	Einzelstrang-Desoxyribonukleinsäure
ssRNA	Einzelstrang-Ribonukleinsäure
SSP	Sequenz-spezifischer Primer
STAT	Signaltransduktor und Transkriptionsaktivator (Signal Transducer and Activator of Transcription)
T	Transmission
Taq	Thermus aquaticus
TCR	T-Zell-Rezeptor (T-Cell Receptor)
T1D	Typ-1-Diabetes mellitus
TDT	Transmissions-Disequilibrium-Test
Tg	Thyreoglobulin
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (Transforming Growth-Factor)
TH	T-Helfer-Lymphozyt
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (Toll-Like-Receptor)
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	Thyreoperoxidase
TRAF	TNF-Rezeptor-Associated Factor
TRAK	TSH-Rezeptor Antikörper

Abkürzungsverzeichnis

TRH	Thyreotropin freisetzendes Hormon (Thyreotropin Releasing Hormon)
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
UK	Vereinigtes Königreich (United Kingdom)
UV	Ultraviolettes Licht
VISA	Virus-induzierter Signaladaptor (Virus-Induced Signalling Adaptor)
vs.	Versus
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der menschliche Organismus ist ständig vielfältigen Krankheitserregern und Substanzen ausgesetzt, die ihm Schaden zufügen können. Mit Hilfe einer großen Anzahl verschiedener Zellen und Moleküle ist er in der Lage, sich dagegen zu schützen. Diese zellulären und humoralen Faktoren bilden das Immunsystem mit seinen grundlegenden Funktionsaspekten: Die Erkennung einer Infektion und deren Bekämpfung, die Selbstregulation und den Schutz vor überschießender Aktivierung von Effektormechanismen und die Speicherung von Informationen über den Angreifer. Bei der Betrachtung des Systems wird zwischen einem angeborenen und einem adaptiven Teil unterschieden.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Zur angeborenen Immunität tragen Plasmaproteinsysteme wie das Komplementsystem, das Gerinnungs/Fibrinolysesystem oder das Kinin-System bei. Darüber hinaus sind zelluläre Elemente (Neutrophile Granulozyten, Mastzellen, Thrombozyten, Endothelzellen, Makrophagen, dendritische Zellen und Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen)) beteiligt. Die Zellen verwenden ihrerseits verschiedene molekulare Systeme, um die der Abwehr dienende Entzündungsreaktion zu vermitteln. Solche Systeme bestehen entweder aus präformierten Molekülen, die in Granula gespeichert sind und bei Bedarf ausgeschüttet werden (vasoaktive Amine wie Histamin und Serotonin sowie lysosomale Enzyme) oder basieren auf Molekülen, die auf entsprechende Stimulation hin von der Zelle neu synthetisiert werden (Prostaglandine, Leukotriene, Plättchenaktivierender Faktor, aktive Sauerstoffverbindungen, Stickstoffmonoxid, Zytokine, Typ-1-Interferone (IFN1)). Das angeborene

Immunsystem unterscheidet Antigene dahingehend, ob sie körpereigen oder körperfremd sind. Es reagiert schnell und sehr effektiv auf eine Vielfalt von Pathogenen, ist aber verhältnismäßig starr und unspezifisch in seiner Reaktionsweise. Die Zellen der angeborenen Immunität erkennen über ihre Rezeptoren die eingedrungenen Pathogene an regelmäßigen Mustern und einfachen Molekülstrukturen, die auf vielen Mikroorganismen, nicht jedoch auf körpereigenen Zellen vorkommen. Diese Molekülmuster werden als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (Pathogen-associated-molecular-patterns – PAMPs) bezeichnet, die Rezeptoren der Immunzellen als Mustererkennungsrezeptoren (Pattern-Recognition-Receptors – PRRs).

1.1.1.1 Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems

In den meisten Fällen wird ein eindringender Mikroorganismus durch einkernige Makrophagen sofort erkannt. Zusammen mit anderen Zellen bilden sie die Gruppe der Phagozyten, die in einem aktiven Prozess das gebundene Pathogen aufnehmen. Mit Hilfe von Enzymen, Peptiden und Proteinen aus dem Lysosom sowie durch die Bildung toxischer Produkte töten sie den phagozytierten Mikroorganismus ab und präsentieren aufgenommene und prozessierte Pathogenbestandteile den Zellen des adaptiven Immunsystems. Bei der Wechselwirkung zwischen Erreger und Gewebemakrophagen werden letztere zur Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und anderen chemischen Mediatoren angeregt. IL-1, IL-2, IL-6, CXCL-8, IL-12 und TNF α sind wichtige Beispiele für solche Mediatoren [Janeway *et al.*, 2009]. Zu den Effektormechanismen der angeborenen Immunität gehören neben der Phagozytose und der Sekretion von Chemo- und Zytokinen auch die Präsentation der prozessierten Antigenpeptide, um die adaptive Immunantwort zu ermöglichen. Hierzu sind die Moleküle des Humanen-Leukozyten-Antigen- (HLA-) Systems unabdingbar. Die von den Makrophagen freigesetzten Zytokine (v.a. Tumornekrose-Faktor- α (TNF α), Interleukin (IL)-1 β und IL-6) haben über die lokalen Effekte hinaus auch Auswirkungen auf den Gesamtorganismus. Die

hepatische Synthese von Akute-Phase-Proteinen, die Mobilisation von Neutrophilen im Endothel, die Erhöhung der Körpertemperatur und die vermehrte Bereitstellung von Energie aus Muskeln und Fettgewebe sind Beispiele für systemische Reaktionen auf Zytokinstimulation. Eine effektive Zerstörung von Krankheitserregern ermöglicht darüber hinaus auch die Aktivierung des Komplementsystems, das ebenfalls zu den Effektormechanismen der angeborenen Immunität gezählt wird.

1.1.2 Pathogen assoziierte molekulare Muster und Mustererkennungsrezeptoren

Molekulare Strukturen, die das angeborene Immunsystem als zu einem Pathogen gehörig erkennt, aktivieren die Reaktion. Solche molekularen Muster sind z.B. mannosereiche Oligosaccharide, Proteoglykane und Lipopolysaccharide in der bakteriellen Zellwand. Im Fall von Viren sind die Muster meist virale Nukleinsäuren wie doppelsträngige RNA (dsRNA), die in infizierten Zellen bei der Virusvermehrung entstehen, genomische Einzelstrang-RNA (ssRNA) oder virale DNA. Genomische ssRNA von ssRNA-Viren (z.B. Influenzaviren) ist gekennzeichnet durch ein Triphosphat am 5'-Ende. Virale DNA ist sehr C-G-reich und wird, anders als zelleigene DNA, im Zytosol nicht durch Methylierung maskiert. DsRNA kommt nur in virusinfizierten Zellen vor [Doerr *et al.*, 2010]. Wichtige Rezeptoren, die diese molekularen Muster erkennen, sind Toll-ähnliche-Rezeptoren (TLR) und Retinsäure-induzierbares-Gen-I-ähnliche-Rezeptoren (RLR). Die TLR sind eine Gruppe membrangebundener Rezeptoren, die durch ihre Strukturspezifität zwischen verschiedenen Arten von Krankheitserregern unterscheiden können und die Entwicklung einer geeigneten Immunantwort stützen [Bowie und Haga, 2005].

1.1.3 RIG-ähnliche-Rezeptoren

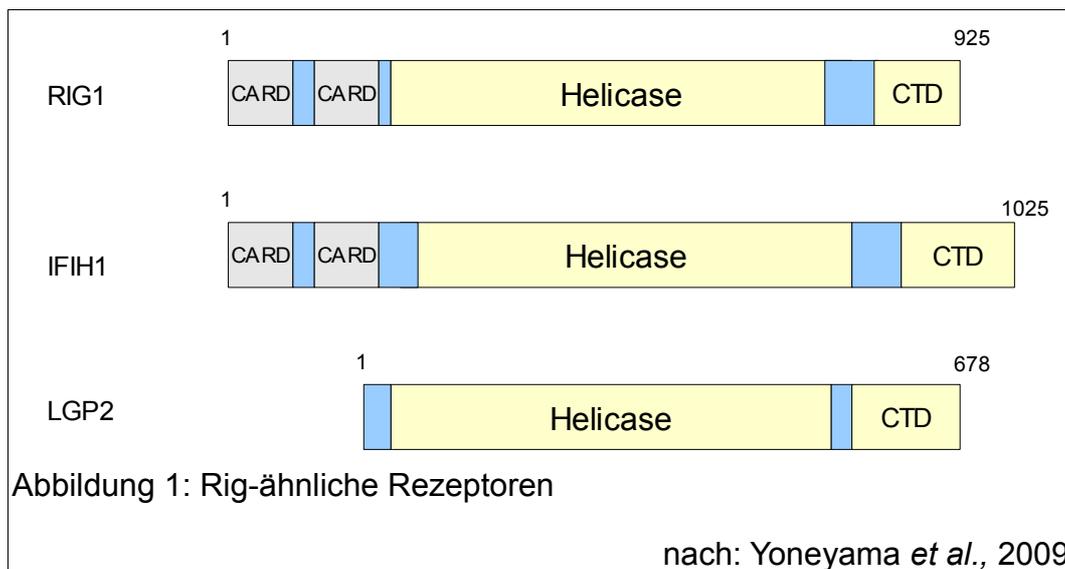
Zur zytosolischen Erkennung viraler RNA besitzen Immun- und Nicht-Immunzellen neben den TLR auch membranunabhängige Rezeptoren. Zu diesen membranunabhängigen Rezeptoren gehören die RLR. Bisher werden drei Moleküle zu dieser Gruppe gezählt: Retinsäure-induziertes-Gen-Protein 1 (RIG1), Interferoninduzierbare Helicase 1 (IFIH1) und Labor-für-Genetik-und-Physiologie-2“ (LGP2) [Yoneyama und Fujita, 2009].

1.1.3.1 Struktur und Liganden

RIG1 ist der Prototyp der Familie [Kawai *et al.*, 2009], er besitzt eine Tandem-Caspase-Rekrutierungs-Domänen-ähnliche Region (CARD) an seinem N-Terminus, die als Interaktionsdomäne zu anderen CARD-besitzenden Proteinen fungiert. Daneben ist ihnen eine zentrale DexD/H Helicase Domäne eigen, die ATP-bindende Motive zeigt. C-terminal befindet sich eine Repressor-Domäne, die mit der RNA interagiert [Saito *et al.*, 2007]. In ruhenden Zellen liegt RIG1 als inaktives Monomer vor. Eine virale Infektion und die Bindung zu RNA veranlasst das Molekül zu Konformationsänderungen und Selbstassoziation, wodurch die CARD-Domäne zur Interaktion mit weiteren Signalmolekülen freigegeben wird. IFIH1 beinhaltet ebenfalls die Tandem-CARD-ähnliche Region und eine DexD/H Helicase-Domäne, jedoch dient die C-terminale Region nicht in gleicher Weise wie bei RIG1 als negativer Regulator [Saito *et al.*, 2007, Yoneyama *et al.*, 2005]. LGP2 hat die DexD/H-Helicase-Region sowie die Regulationsdomäne, nicht aber eine CARD-ähnliche-Region [Yoneyama *et al.*, 2005; Rothenfusser *et al.*, 2005; Komuro *et al.*, 2006]. Es wird vermutet, dass LGP2 eine inhibitorische Rolle bei der RLR-vermittelten Virusantwort spielt [Yoneyama *et al.*, 2005]. Der genaue molekulare Mechanismus ist bisher nicht eindeutig geklärt: Die direkte Interaktion von LGP2 mit inhibitorischer Wirkung der C-terminalen Domäne [Saito *et al.*, 2007], das Abfangen eigentlicher RIG1-Liganden [Takahashi *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Pippig *et al.*, 2009] oder Interferenzen mit dem Interferon-

Promotor-Stimulationsprotein (IPS) und kompetitive Hemmung des Inhibitorischen κ B-Kinase-Komplexes- ϵ (IKK ϵ) im Signalweg von RIG1 [Komuro *et al.*, 2006] sind beschriebene Mechanismen.

Liganden der RLR sind genomische Virusnukleinsäuren, die sich im Zytosol der infizierten Zelle befinden. Einzelstrang-RNA mit 5'-Triphosphaten wird von RIG1 erkannt [Hornung *et al.*, 2006], während sowohl RIG1 und IFIH1 dsRNA erkennen können. Es scheint die Länge der dsRNA-Moleküle zu sein, die sie bevorzugt an IFIH1 (große Moleküle über 1kb in der Länge) oder an RIG1 (kleinere dsRNA-Fragmente und homopolymere Nukleotidsequenzen) binden lassen [Kato *et al.*, 2008]. Auch in der Virusspezifität unterscheiden sich die RLR. So wird der Signalweg über RIG1 von anderen Viren aktiviert als der Weg über IFIH1 [Wilkins und Gale, 2010].

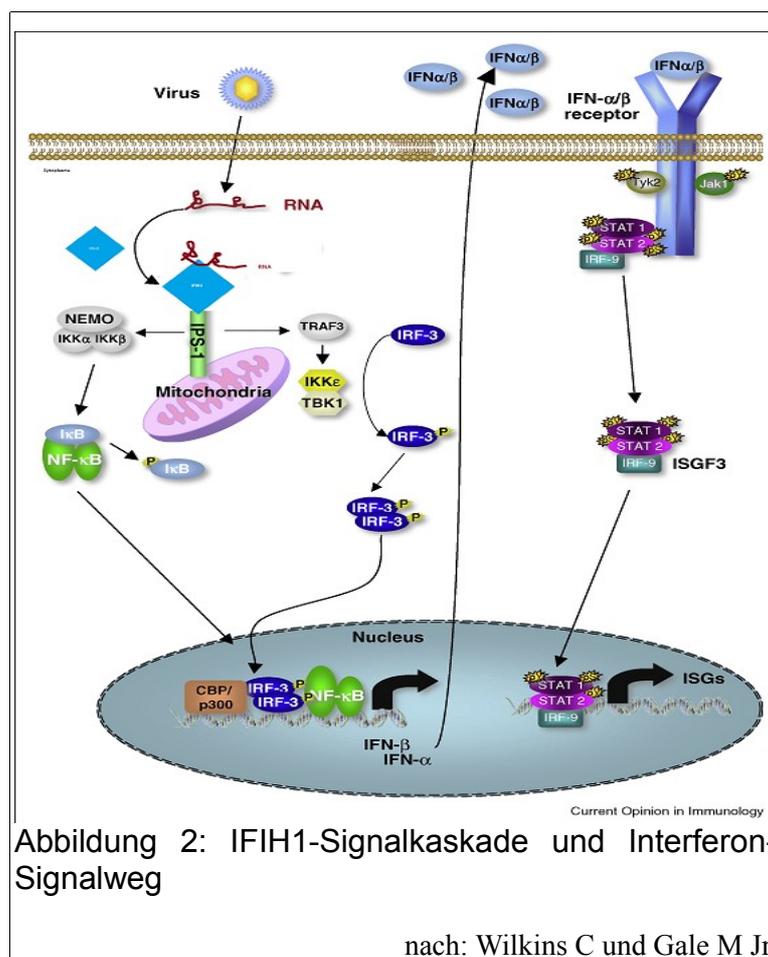


1.1.3.2 RLR-vermittelte Signaltransduktion

Bindet RNA an die N-terminale Domäne, so kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und die CARD-Region wird frei. Sie kann nun an die CARD-Domäne eines Adaptermoleküls an der äußeren

Einleitung

Mitochondrienmembran binden. Dieser Adapter wurde 2005 von vier Gruppen unabhängig voneinander beschrieben und ist unter den Namen Interferon-Promotor-Stimulations-Protein 1 (IPS-1) [Kawai *et al.*, 2005], Mitochondriales-Antiviral-Signalisierendes Protein (MAVS) [Seth *et al.*, 2005], Virus-induzierter Signaladapter (VISA) [Xu *et al.*, 2005] und CARD-Adaptor-induzierendes INF β (Cardif) [Meylan *et al.*, 2005] bekannt. Für eine erfolgreiche Aktivierung von Cardif sind Mitglieder der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Assoziierter-Faktor-Familie (TRAF) nötig. Interaktionen zwischen TRAF 3, 2 und 6 [Yoneyama *et al.*, 2009] transmittieren Signale an Proteinkinasen wie die aus der Familie der NF- κ B-Inhibitoren (IKK) [Fitzgerald *et al.*, 2003]. Ein Komplex aus weiteren Proteinen führt zur Phosphorylierung von IRF-3 und IRF-7, die als Homo- oder Heterodimer in den Nukleus transloziert werden, wo die Induktion der Expression von Typ-1-IFN stattfindet [Yoneyama *et al.*, 2009].



1.1.4 Das Typ-1-Interferon-System

Interferon wurde erstmals 1957 von Alick Isaacs und Jean Lindemann beschrieben [Doerr *et al.*, 2010; Lindemann *et al.*, 1957]. Sie fanden heraus, dass geeignete Zellen auf die Stimulation durch Viren einen Botenstoff ausschütten können, der andere Zellen generell vor Virusbefall schützt. Heute werden drei Typen von INF unterschieden. Auf die Typ-1-IFNe wird unten näher eingegangen. Typ 2-IFN (IFN γ) wird von T-Zellen und NK-Zellen gebildet und wirkt immunregulatorisch und antiviral. Typ 3-IFNe (mit 3 Subtypen) aktivieren den Typ-1 Signalweg über einen eigenen Rezeptor und etablieren so ähnlich wie Typ-1-IFNe, aber unabhängig von ihnen einen antiviralen Zustand [Maeger *et al.*, 2006].

1.1.4.1 Typ-1-Interferon und Signalwege

Typ-1-INFe werden durch Viren induziert und in den meisten Körperzellen produziert, wobei plasmazytoide dendritische Zellen als spezialisierte Zellen ausgemacht werden konnten, die bis zu 1000fach höhere Interferonspiegel erreichen als andere Zellarten [Siegal *et al.*, 1999]. Mitglieder der IFN1-Familie sind IFN α (mit 12 Subtypen) und β , IFN- κ (virusinduziert in Keratinozyten, Monozyten und konventionellen dendritischen Zellen), IFN- ω (virusinduziert) und IFN- ϵ (hormonell induziert). Typ-1-IFN sind in einer Genfamilie aus 13 IFN α -Genen (IFNA1-13, die Genprodukte von IFNA1 und 13 sind identisch) auf Chromosom 9p21.1-9p21.2 kodiert [Maeger *et al.*, 2006]. Die Region erstreckt sich über 350-kb, die reifen Proteine bestehen aus 166 Aminosäuren. Sie nehmen in der Interferon-Familie eine physikochemische Sonderstellung ein, da sie eine hohe Stabilität gegenüber Hitze (65°C) und Säure (pH 2) besitzen [Cederblad *et al.*, 1991; Feldman *et al.*, 1994; Kadowaki *et al.*, 2001]. Die Struktur der Typ-1-IFN zeigt 5 α -Helices, die durch vier Loops verbunden sind. Die α -IFN sind intramolekular durch zwei Disulfidbrücken verbunden, β -IFN haben nur eine solche Disulfidbrücke [Doerr *et al.*, 2010]. Sezernierte Typ-1-INF

entfalten ihre Wirkung an den heterodimeren IFN α / β -Rezeptoren (IFNAR), deren Aktivierung letztlich im Zellkern dazu führt, dass die Transkription hunderter IFN-stimulierbare Gene (ISG) angeregt wird [Stetson *et al.*, 2005]. Der Hauptsignalweg, der durch die Bindung von IFN an den Rezeptor aktiviert wird und das Signal so zum Zellkern leitet, ist der JAK-STAT-Signalweg [Van Boxel-Deseire *et al.*, 2006]. Die Konformationsänderung des IFNAR führt zur Aktivierung von Proteinkinasen der Janus-Familie. Diese Kinasen phosphorylieren zwei Transkriptionsfaktoren der Signal-Transkriptoren und Aktivatoren der Transkription (STAT)-Familie. Am Ende dieser Signalkaskade werden gleichzeitig mehrere hundert Gene aktiviert. Die Produkte dieser Gene sind es dann, die das „antivirale Milieu“ bedingen. Speziell antiviral wirksame Proteine, die vermehrt entstehen, sind zum Beispiel die dsRNA-abhängige Serin/Threonin Proteinkinase (PKR) und die 2'5'-Oligoadenylatsynthase sowie MxGTPasen. PKR phosphoryliert den Translations-Initiationsfaktor eIF2- α , wodurch die Proteinsynthese in der Zelle zum Erliegen kommt. Die 2'-5'-Oligoadenylatsynthase benötigt dsRNA zur Synthetisierung von Oligo(A). Ist Oligo(A) vorhanden, kann die RNase L einzelsträngige RNA degradieren. Die MxGTPasen erkennen und inaktivieren Nukleokapside einiger Viren (z.B. Paramyxoviren wie das Masernvirus oder Orthomyxoviren wie Influenza) [Doerr *et al.*, 2010].

1.1.5 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem umfasst T- und B-Lymphozyten, Antikörper (Immunglobuline) und ebenfalls eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren (z.B. IL, Typ-2-INF, TNF, transformierender Wachstumsfaktor (TGF), Koloniestimulierender Faktor (CSF)) [Mutschler *et al.*, 2001]. Ein Zusammenspiel von Immunglobulinen, Antigenpräsentierenden Zellen (APC) und Lymphozyten ermöglicht dem adaptiven Immunsystem, spezifisch auf ein bekanntes Antigen zu reagieren und durch das Prinzip der klonalen Lymphozytenselektion und der Antikörpervariabilität ein immunologisches Gedächtnis aufzubauen. Es werden

zwei Haupttypen von Lymphozyten unterschieden. Einerseits die B-Lymphozyten, die im Knochenmark reifen und die Produktion zirkulierender Antikörper gewährleisten; andererseits die T-Lymphozyten, die im Thymus reifen,prozessierte Peptidstrukturen von Krankheitserregern erkennen und in Form verschiedener Effektorzellen Immunantworten vermitteln [Janeway *et al.*, 2009]. Ein wichtiger Punkt im Rahmen der adaptiven Immunantwort ist die Erkennung der Antigene, für die die Rezeptoren der T- und B-Zellen und die Präsentation durch HLA-Moleküle unabdingbar sind. Der B-Zell-Rezeptor (BCR) ist ein Komplex aus IgM/IgD-Antikörpern mit zwei akzessorischen Ketten. Der T-Zell-Rezeptor (TCR) besteht aus zwei transmembranären Ketten. Er bildet mit Korezeptoren, dem mehrkettigen Molekül der Differenzierungsgruppe (CD) 3 und je nach Differenzierung mit dem CD8- oder dem CD4-Molekül einen Komplex. Der TCR-Komplex ist nicht wie der BCR-Komplex in der Lage, freie Antigene zu erkennen. Er erkennt das zu seinem Rezeptor passende Antigen nur dann, wenn es von APC zu kürzeren Peptidfragmenten gespalten und diese Peptidstrukturen in der Furche eines HLA-Moleküls eingebettet präsentiert wird [Chaplin, 2010].

1.1.5.1 Adaptives Immunsystem und Selbst-Toleranz

Das adaptive Immunsystem ist in der Lage, eine Vielzahl von Erregern zu erkennen und diese spezifisch zu bekämpfen. Die Merkmale eines Erregers können gespeichert werden, das adaptive Immunsystem verfügt also über ein immunologisches Gedächtnis. Die große Vielfalt von Antigenen, die das adaptive Immunsystem erkennt, erklärt sich aus der Entwicklung der Lymphozyten, während der sich durch mehrschrittige Genumlagerungen und die zufällige Kombination von unterschiedlichen Gensegmenten Rezeptoren bilden, die hochspezifisch für eine einzige antigene Struktur sind.

1.1.5.2 Zentrale Toleranz von T- und B-Zellen

Die aus dem Knochenmark stammenden T-Vorläuferzellen werden erst im Thymus zu funktionierenden Bestandteilen der adaptiven Immunantwort. Ob die Zellen den Thymus als reife T-Zellen verlassen oder vorher zugrunde gehen, hängt von ihrer Interaktion mit APCs im Thymus ab. Bleibt ihre Reaktion auf HLA/Peptid-Komplexe der Thymusepithelzellen im Kortex und auf HLA/Peptidkomplexe anderer APCs im Thymusmark unter einer bestimmten Schwelle, sterben sie ab. Da bei diesem Selektionsvorgang ein Aktivierungssignal für das Überleben notwendig ist, wird von positiver Selektion gesprochen. Zellen, die mit körpereigenen Antigenen zu stark reagieren, werden ebenfalls vernichtet – sie werden negativ selektiert.

Zentrale B-Zell-Toleranz wird im Knochenmark durch Deletion, Rezeptoredition und -modulation der B-Zell-Klone, die eine hohe Affinität zu Autoantigenen besitzen, garantiert [Janeway und Murphy, 2009].

1.1.5.3 Periphere Toleranz

Trotz der zentralen Toleranz gelangen stets einige autoreaktive Zellen in die Peripherie, eine periphere Toleranzentwicklung wird nötig. Periphere Toleranzmechanismen der T-Zellen sind die Ignoranz von niedrig konzentrierten Antigenen, die Konkurrenz mit nicht autoreaktiven T-Zellen um limitierte physiologische Nischen, die Induktion von Apoptose durch starke antigene Reize (Deletion), Anergie (das antigene Signal wird als solches erkannt, führt aber nicht zur Stimulation) und die Suppression durch regulatorische T-Zellen [Sfriso *et al.*, 2010]. Periphere Toleranzmechanismen bei B-Zellen sind weniger entscheidend, da die Gefahr durch autoreaktive B-Lymphozyten kleiner ist als die durch autoreaktive T-Zellen. B-Zellen sind bei der effektiven Produktion von Autoantikörpern in der Regel auf die Interaktion mit aktivierten autoantigenspezifischen T-Zellen angewiesen [Janeway und Murphy, 2009].

1.2 Autoimmunität

Kommt es zu einem Versagen der Selbst-Toleranz, reagiert das Immunsystem vorübergehend oder andauernd gegen körpereigene Antigene. Die stets vorhandenen autoreaktiven Zellen aktivieren dann aggressive Immunprozesse. Zur Aktivierung kann es im Rahmen von Infektionen kommen, wenn genügend kostimulatorische Faktoren vorhanden sind (TCR-HLA und Bindung von CD28 auf der T-Zelle mit einem B7-Liganden-CD80 und CD86). Die normalerweise anergen Zellen werden aktiv [Janeway und Murphy, 2009]. Bleibt die pathologische Immunreaktion gegen körpereigenes Gewebe über einen längeren Zeitraum bestehen, wird eine Autoimmunerkrankung manifest.

Es ist durch eine Vielzahl von Familien- und Assoziationsstudien belegt, dass die meisten Autoimmunerkrankungen in ihrer Ätiologie genetische Komponenten besitzen. Die bisher deutlichsten Zusammenhänge konnten für Polymorphismen im Bereich der HLA-Region gefunden werden [Badenhoop *et al.*, 1995; Raha *et al.*, 2009; Brand und Gough 2010]. Die HLA-Gene liegen auf Chromosom 6p21 im HLA-Komplex. Auf der Oberfläche fast aller kernhaltigen Zellen finden sich HLA-I-Moleküle, die CD8-positiven T-Zellen (zytotoxische T-Zellen) antigene Peptide präsentieren. Antigenpräsentierende Zellen (z.B. dendritische Zellen, B-Lymphozyten oder Langerhans-Zellen) tragen HLA-II-Moleküle und die von ihnen präsentierten Antigenpeptide werden von CD4-positiven Lymphozyten (T-Helferzellen) erkannt [Janeway *et al.*, 2009]. Funktionell spielen die Veränderungen im Bereich der HLA-II-Gene eine besondere Rolle, denn ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation hängt von der Aminosäuresequenz ab. Ist diese verändert, so verändert sich in der Folge auch die Spezifikation der Immunantwort [Tait und Gough, 2003; Dietel *et al.*, 2003]. Oft entwickeln jedoch Individuen, die Risikoallele tragen, keine Autoimmunität. Risikoallele machen ein Individuum also anfällig, sind aber nicht alleinverantwortlich für die Manifestation einer assoziierten Erkrankung. Neben dem Vorliegen bestimmter HLA-Typen sind auch Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) in anderen Genen mehr oder weniger eng mit dem

Einleitung

Auftreten von autoimmunen Erkrankungen assoziiert. SNPs sind Positionen im Genom, die sich bei zwei Individuen durch eine einzelne Base unterscheiden. Eine genetisch bedingte Anfälligkeit für eine Autoimmunerkrankung beim Menschen wird daher auf die Kombination von Anfälligkeitsallelen an mehreren Loci zurückgeführt. Einige Beispiele für Risikogene zeigt die Tabelle:

Tabelle 1: Anfälligkeitsgene für endokrine Immunopathien mit angenommener Rolle im Pathomechanismus

Gen	Assoziierte endokrine Autoimmunerkrankungen	Angenommene Rolle der genetischen Variation
HLA-DR,DQ (Klasse II)	Typ-1-Diabetes mellitus, M. Basedow, Hashimoto-Thyreoditis	Antigenpräsentation an CD4+T-Zellen
HLA-B (Klasse I)	Typ-1-Diabetes mellitus	Antigenpräsentation an CD8+ T-Zellen
HLA-C (Klasse I)	M. Basedow	Antigenpräsentation an CD8+ T-Zellen
Insulin	Typ-1-Diabetes mellitus	Expression im Thymus zur Förderung negativer Selektion
TSH-Rezeptor	M. Basedow	? Antigenerkennung ? Expression im Thymus
CTLA-4	Typ-1-Diabetes mellitus, M. Basedow, Hashimoto-Thyreoditis	Inhibitorische T-Zell Signalwege
PTPN22	Typ-1-Diabetes mellitus, M. Basedow, Hashimoto-Thyreoditis	? T-Zell-Signalwege
CD25	Typ-1-Diabetes mellitus	? Aktivität und Funktion regulatorischer T-Zellen
IFIH1 (MDA5)	Typ-1-Diabetes mellitus	Signalwege der angeborenen Immunantwort
FCRL3	M. Basedow	unbekannt
KIAA0350	Typ-1-Diabetes mellitus	Unbekannt

? = vermuteter Mechanismus, nicht abschließend geklärt

nach: Anderson, 2008

Neben der genetisch fixierten Komponente lassen sich auch Zusammenhänge zwischen permissiven immunologischen Zuständen und der Manifestation von Autoimmunerkrankungen beobachten. So zeigt die Manifestation des Typ-1-Diabetes mellitus (T1D) eine saisonale Häufung [Lévy-Marchal *et al.*, 1995]. Die Geburtsmonate von Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen sind anders verteilt als die von nicht betroffenen Individuen [Krassas *et al.*,

2007]. Ein vermehrtes Auftreten nach bestimmten Infektionen und die Beobachtung von viraler DNA/RNA im Genom betroffener Gewebe stützen die Theorie, dass Infektionen bei entsprechend immunologisch empfänglichen Individuen entscheidend zur Entstehung eines entzündlichen Autoimmunprozesses beitragen [Sarzi-Puttini *et al.*, 2005; Zampieri *et al.*, 2006; Chevrel *et al.*, 2000; Yousef *et al.*, 1990; Doria *et al.*, 2008; Randone *et al.*, 2008; Kallenberg *et al.*, 2008]. Es gibt verschiedene Modelle, die diesen Zusammenhang erklären können: „Molekulares Mimikry“ beschreibt die Tatsache, dass manche Pathogene Elemente tragen, die in ihrer Aminosäuresequenz oder ihrer Struktur einem Selbst-Antigen sehr ähnlich sind. Die Immunantwort kann sich dann im Rahmen von Kreuzreaktivität gegen das korrespondierende körpereigene Peptid richten [Sfriso *et al.*, 2009]. Molekulares Mimikry spielt eine Rolle zum Beispiel in der Entstehung von verschiedenen Autoimmunphänomenen bei Erkrankungen wie dem Rheumatischen Fieber, dem Systemischen Lupus Erythematodes (SLE) und der Systemischen Sklerose [Gershwin *et al.*, 2008]. Ein weiteres Modell sieht Proteine in der Verantwortung, die normalerweise in dem Immunsystem unzugänglichen Kompartimenten vorkommen, bei massivem Zelltod frei werden und immunogen wirken. Gewebeschäden, Zelltod, oxidativer Stress, die Produktion von freien Radikalen und Reparaturprozesse, wie sie bei Infektionen in unterschiedlichem Ausmaß vorkommen, können dazu führen, dass Proteine, die normalerweise als körpereigen erkannt werden, vom Immunsystem nun als körperfremd betrachtet werden und eine autoaggressive Immunantwort auslösen [Sfriso *et al.*, 2010]. Darüber hinaus können Superantigene eine gegen den eigenen Organismus gerichtete Immunantwort auslösen. Superantigene sind stark immunogen wirkende Proteine, die auf verschiedenen Bakterien und virusinfizierten Zellen vorkommen. Sie sind in der Lage, eine Vielzahl von T-Zell-Klonen verschiedener Spezifitäten ohne vorherige Prozessierung zu aktivieren. Werden T-Zellen durch Mechanismen aktiviert, die nicht an die spezifische Erkennung durch den TCR gekoppelt sind, kann es zu verstärkter Prozessierung und Präsentation von Selbst-Antigenen kommen, was die Expansion der Immunantwort auf diese neuen Antigene zur Folge

haben kann. Diese Erweiterung einer stattfindenden Immunantwort auf mehr und mehr Selbstantigene beschreibt der Begriff Epitope Spreading (Epitoperweiterung). Sowohl in der Pathogenese als auch in der Ausprägungsvariabilität von Autoimmunerkrankungen spielt dieser Mechanismus eine Rolle [Sfriso *et al.*, 2010].

Da das angeborene Immunsystem die adaptive Immunantwort auslösen kann, kann es bei Fehlfunktion in der Folge vom adaptiven Immunsystem getragene autoreaktive Prozesse in Gang setzen. Die Aktivierung von PRRs führt zur Sekretion von proinflammatorischen Zyto- und Chemokinen wie IFN, TNF, IL-1, IL-6 und IL-12 [Janeway und Murphy, 2009]. Viren können PRRs aktivieren und über intrazelluläre Signalwege, die Expression von IFN-1 regulierten Genen induzieren. IFN- α hat direkte und indirekte Effekte auf APC, T- und B-Zellen [Maeger *et al.*, 2006]. Es steigert die Expression von TLR-7 auf B-Zellen und hat eine erhöhte Zelltodrate zur Folge. Dabei frei werdende bestimmte RNA- und DNA-Strukturen können autoantigene Eigenschaften haben [Krug, 2008]. So erkennen auch RLRs Eigen-RNA; Malathi *et al.* (2007) haben beschrieben, wie virale RNA die Rnase L aktiviert, durch die Wirts-RNA in kleine RNA-Stücke zerlegt wird, die dann von RIG1 und IFIH1 erkannt werden kann. Inwieweit dieser Weg zur Autoimmunität beiträgt, ist jedoch bisher nicht abschließend geklärt.

Zusammengefasst betrachtet treten also viele Autoimmunerkrankungen familiär gehäuft auf und weisen eine mehr oder weniger enge Assoziation mit bestimmten HLA-Genotypen und anderen Genorten auf. Die Erkrankungswahrscheinlichkeit für monozygote Zwillinge liegt aber weit unter 100%, daher müssen bei der Entstehung erbliche Faktoren und Umwelteinflüsse zusammenwirken. Als Trigger wurden neben Infektionen auch Medikamente (z.B. IFN α , Amiodaron) [Prummel *et al.*, 2004], Stress [Besedowski und del Rey, 1996; Sternberg, 2001; Elenkov und Chrousos, 2002], hormonelle Situation [Ackermann, 2006] und Nikotinabusus [Prummel und Wiersinga, 1993; Arnson *et al.*, 2010] beschrieben.

1.2.1 Virale Infektionen und Autoimmunität

Virale Infektionen werden vielfach als Trigger für die Manifestation autoimmuner Erkrankungen bei genetisch anfälligen Individuen angegeben [Chevrel *et al.*, 2000; Ercolini und Miller, 2009]. Andererseits gibt es auch Hinweise, dass bestimmte Virusinfektionen der Entwicklung von Autoimmunität entgegenwirken [Christen *et al.*, 2004]. So scheinen Enteroviren bei der Pathogenese des T1D eine ambivalente Rolle spielen zu können; es wird postuliert, dass schnell replizierende Virusstämme als Auslöser fungieren können, während Viren mit langsamen Replikationszyklen durch die Aktivierung immunregulatorischer Vorgänge protektiv gegenüber T1D wirken können [Kanno *et al.*, 2006; Filippi *et al.*, 2009]. Als indirekter Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Infektionen und Autoimmunität können epidemiologische Daten betrachtet werden [Lévy-Marchal *et al.*, 1995]. Gleichzeitige saisonale Peaks von bestimmten Virusinfektionen und Manifestationen von Autoimmunerkrankungen legen einen Zusammenhang nahe. Es werden höhere Erkrankungs- und Rezidivraten nach thyreostatischer Therapie bei Morbus Basedow im Frühjahr und Sommer beobachtet [Misaki *et al.*, 2003]. Nicht nur die aktuelle infektiologische Situation spielt eine Rolle, sondern auch das zum Zeitpunkt der Geburt präsente Erregerspektrum. Sowohl für Morbus Basedow als auch für Hashimoto-Thyreoditis konnte ein von der Allgemeinbevölkerung abweichendes Muster in der Verteilung der Geburtsmonate beobachtet werden [Krassas *et al.*, 2007]. Diese Beobachtung könnte auf virale Infektionen als initialen Faktor in der Perinatalperiode hinweisen, die spätere klinische Erkrankung resultierte dann aus den über die Zeit entstehenden Gewebeschäden. Die in diesem Zusammenhang genannte Hygiene-Hypothese basiert auf der Beobachtung, dass in Zeiten und Gegenden mit hohem hygienischen Standard manche Autoimmunerkrankungen wie T1D, [Tuomilehto *et al.*, 1999], MS [Pugliatti *et al.*, 2001] oder CED [Farrokhyar *et al.*, 2001] häufiger sind als unter schlechteren hygienischen Bedingungen. Der Kontakt des Immunsystems mit einer großen Anzahl von Erregern sowie viele Infektionen im Kindesalter und während der Entwicklung des Immunsystems sollen demnach vor der Anfälligkeit für

Fehlregulationen in der Immunantwort schützen. Diese These wurde schon früh in der Allergologie [Blackley CH, 1837] diskutiert und dann auf andere Zustände chronischer Entzündungsvorgänge ausgeweitet. Allein die Auswertung epidemiologischer Daten erlaubt jedoch noch keinen Rückschluss auf eine bestehende Kausalität. Die Zusammenhänge können über epidemiologische Beobachtungen hinaus durch Detektion von Antikörpern gegen virale Strukturen oder durch den direkten Nachweis viraler Nukleinsäuren bei von Autoimmunerkrankungen betroffenen Individuen abgebildet werden. Die Anwesenheit von Antikörpern gegen einen bestimmten Erreger beweist zwar ebenso wie die zeitliche Assoziation mit Infektionen keine kausale Beteiligung an der Pathogenese. Antikörper, die bei Patienten häufiger nachzuweisen sind als bei nicht betroffenen Personen, geben aber weitere Hinweise auf die Beteiligung des jeweiligen Virus oder auf die Beteiligung der spezifischen oder unspezifischen Immunantwort gegen das Virus an der Pathogenese.

Es gibt mehrere Mechanismen, die den epidemiologisch beobachteten Zusammenhang auf zellulärer und molekularer Ebene erklären. Weiter oben wurden bereits einige aus dem Bereich der adaptiven Immunität beschrieben: Molekulares Mimikry, das Freiwerden von Antigenen bei vermehrter Zelltodrate, Superantigene, durch stark immunogenes Milieu aktivierte, normalerweise anerge autoreaktive Zellen und fehlerhafte Apoptoseregulation seien hier noch einmal genannt.

Im Bereich der angeborenen Immunreaktion können einzelne Komponenten an der Induktion von Autoimmunphänomenen beteiligt sein. Die TLR, die PAMPs erkennen, können teilweise auch durch endogene Strukturen aktiviert werden, zu deren Ausschüttung es im Rahmen von Infektionen kommt. Diese Strukturen können dann durch ihre Interaktion mit dem TLRs autoimmune Phänomene initiieren, aufrecht erhalten oder verstärken [Bauer *et al.*, 2009]. Eine weitere wichtige Komponente der angeborenen Abwehr gegen Viren (neben den PRRs) sind die Typ-I-INF, die auch in der Therapie vor allem infektiöser, autoimmuner und maligner Erkrankungen seit Jahren erfolgreich eingesetzt werden. Dabei wird als Nebenwirkung die Ausbildung autoimmuner Schilddrüsenerkrankungen beobachtet [Tomer *et al.*, 2009]. Hier findet sich ein Faktor, der das INF-System

mit der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang bringt. Varianten von IFIH1, einem Gen, das der antiviralen Antwort zugeordnet wird, werden bisher v.a. in Zusammenhang mit T1D gebracht und bieten einen weiteren Anhaltspunkt für eine Verbindung zwischen INF-System, viralen Infektionen und Autoimmunerkrankungen [Herrath, 2009].

1.3 Endokrine Autoimmunopathien

Die heterogene Gruppe der Autoimmunerkrankungen kann nach verschiedenen Gesichtspunkten eingeteilt werden. Unter dem Gesichtspunkt der Effektormechanismen (eher B-Zell-getragen bzw. eher T-Zell-vermittelt) ist wegen der engen Beziehung zwischen T- und B-Zell-vermittelter Immunantwort häufig keine eindeutige Trennung möglich. Daher hat sich im klinischen Alltag die Einteilung nach organspezifischen und systemischen Autoimmunerkrankungen durchgesetzt. Bei organspezifischen Autoimmunerkrankungen wird eher eine Dysregulation der T_{H1} -vermittelten Immunität beobachtet, bei systemischen Krankheitsbildern werden die Fehlregulationen eher im Bereich der T_{H2} -vermittelten Immunantwort und damit in der Aktivierung des B-Zell-Systems gesehen [Liblau *et al.*, 1995; Ghoreschi und Röcken, 2003]. Endokrine Autoimmunopathien werden den organspezifischen Erkrankungen zugerechnet. Sie kommen auf ein einzelnes Organ begrenzt vor, in anderen Fällen sind mehrere Organe betroffen. Besonders häufige Konstellationen werden in Polyendokrinen Syndromen zusammengefasst.

1.3.1 Hashimoto-Thyreoiditis

Der japanische Chirurg und Pathologe Hakaru Hashimoto (1881-1934) beschrieb 1912 die Struma lymphomatosa [Hashimoto, 1912]. Nach ihrem

Erstbeschreiber wird die chronisch-lymphozytäre Schilddrüsenentzündung auch Hashimoto-Thyreoiditis genannt. Die Hashimoto-Thyreoiditis ist die häufigste Ursache der primären Hypothyreose, Frauen sind fünf- bis zehnmals häufiger betroffen als Männer, wobei sich dieser Unterschied erst nach der Pubertät ausprägt. Frauen, die Kinder geboren haben, haben ein höheres Erkrankungsrisiko als Frauen, die nie Kinder geboren haben [Friedrich *et al.*, 2008]. Die Hashimoto-Thyreoiditis tritt familiär gehäuft auf.

Gemäß der allgemeinen Hypothese zur Ätiologie von Autoimmunerkrankungen ist auch bei der Hashimoto-Thyreoiditis die Kombination aus genetischer Prädisposition und auf diese Bereitschaft treffender exogener und endogener Faktoren als ursächlich anzunehmen. Verschiedene assoziierte Genorte sind bekannt und in Tabelle 1 gezeigt. Faktoren wie ein geringes Geburtsgewicht, eine lange Reproduktionsphase [Prummel *et al.*, 2004], Infektionen mit EBV [Vrbikova *et al.*, 1996] und HTLV [Kawai *et al.*, 1996] und anderen Erregern, die Aufnahme hoher Dosen Jod [Rink *et al.*, 1999] und Medikamenteneinnahme (IL-2, IFN α) [Prummel *et al.*, 2004] erhöhen das Risiko der Erkrankung. Betrachtet man die Zytokinmuster bei Betroffenen, so findet sich bei insgesamt gemischtem Bild eine Dominanz der von T_{H1}-Zellen sezernierten Faktoren (IL-2, INF- γ , IL-12, IL-18) [Phenekos *et al.*, 2004]. Das Auftreten von sowohl zytotoxischer Gewebszerstörung als auch von typischen Antikörpern und einem B-zellulären Infiltrat lassen die Beteiligung unterschiedlicher Mechanismen aus der T- und B-Zell-vermittelten Immunität erkennen. Das T-lymphozytäre Infiltrat besteht aus CD4- und CD8-T-Zellen, die durch direkte Apoptoseinduktion über Granzyme und durch Nekroseinduktion durch Perforin zur Gewebszerstörung beitragen. Die T-zellulären Zytokine TNF α , IL-1, und IFN γ können ebenfalls zur erhöhten Apoptoserate über Fas beitragen [Giordani *et al.*, 1997]. Die Antikörper gegen Thyreoglobulin (Tg-Ak) und gegen Thyreoperoxidase (TPO-Ak) sind wichtige diagnostische Marker, der pathogene Effekt ist aber eher zweitrangig und liegt wohl in der Verstärkung einer bereits ablaufenden Immunreaktion [Dietel, 2003].

Initial kann es zur milden Hyperthyreose kommen, die selten klinisch relevant ist. Oft verläuft der zellzerstörende Prozess klinisch so blande, dass erst die

Anzeichen einer schleichend-progredienten Hypothyreose zur Diagnosestellung führen. Das Symptomenpektrum beinhaltet Gewichtszunahme, Kälteempfindlichkeit, Obstipation, Müdigkeit, Muskelschwäche, brüchiges Haar, kühle, teigige Haut und Bradykardie in wechselnder Ausprägung und Kombination. Der Drüsenkörper kann atrophisch verkleinert sein oder zu einer hypertrophen Struma anwachsen. Ein diffus echoarmes Bild, im Verlauf manchmal auch fibrotisch verändert mit Hypervaskularisation deutet in der Schilddrüsen(doppler)sonographie auf eine Hashimoto-Thyreoditis hin. In der mikroskopischen Untersuchung eines Feinnadelpunktates finden sich eine deutliche lymphozytäre Infiltration des Schilddrüsengewebes, oft mit Nachweis von Plasmazellen [Feldkamp, 2009].

Die serologische Untersuchung bringt neben der Hormonkonstellation einer Hypothyreose (T3 und T4 erniedrigt bei kompensatorisch erhöhtem Thyroidea-stimulierendem Hormon (TSH) mit überschießendem Anstieg im Test mit TSH-freisetzendem Hormon (TRH)) den Nachweis von Antikörpern gegen Schilddrüsengewebe (Anti-TPO in 90% positiv, Anti-Tg in ca. 40-70% positiv). Antikörper gegen Eiweiße des Jodtransportes (Natriumiodidsympporter und Pendrin) können identifiziert werden, für die Routinediagnostik stehen diese Parameter allerdings noch nicht zur Verfügung [Yoshida *et al.*, 2009]. Die Antikörper gegen Tg und TPO finden sich in niedriger Höhe auch bei bis zu 5% der Allgemeinbevölkerung und reichen allein zur Diagnosestellung nicht aus; die Diagnose kann sicher gestellt werden, wenn eine zehnfache Erhöhung der Antikörper und eine typische Echoarmut im Sonogramm bestehen. In Fällen mit niedrigen Antikörpertitern sind ergänzend das Vorliegen einer Dysfunktion, Veränderungen im Ultraschall oder eine entsprechende Klinik zu fordern [Feldkamp, 2009].

Bei gesicherter Diagnose sollte auch ohne klinische Symptomatik therapiert werden. Ziel ist eine euthyreote Stoffwechsellage. Hierzu eignet sich die Substitution mit L-Thyroxin in einschleichender Dosierung, um eine kardiale Belastung zu vermeiden. Die Erhaltungsdosis, auf die von einer Anfangsdosis von 25-50 µg gesteigert wird, liegt meist bei 1-2 µg L-Thyroxin pro Kilogramm Körpergewicht (100-150 µg). In der Einstellungsphase sind engmaschige TSH-

Kontrollen sinnvoll, bei Erreichen eines TSH im unteren bis mittleren Normbereich ohne überschießende Reaktion im TRH-Test und subjektiver Beschwerdefreiheit, kann die bestehende Dosis als Erhaltungsdosis akzeptiert werden und die Laborkontrollen in größeren Abständen erfolgen [Feldkamp, 2009]. Manifestiert sich initial eine passagere Hyperthyreose, ist eine symptomorientierte Therapie mit nicht kardioselektiven β -Blockern indiziert [Classen, 2004].

1.3.2 Morbus Basedow

1840 beschrieb der Merseburger Amtsarzt Carl von Basedow eine Erkrankung mit der Symptomtrias Exophthalmus, diffus vergrößerte Schilddrüse und Tachykardie – der Merseburger Trias [Basedow, 1840]. Unabhängig davon wurde etwa zur gleichen Zeit dieselbe Krankheit vom irischen Chirurgen Robert James Grave beschrieben. Im deutschen Sprachraum ist bis heute die Bezeichnung Morbus Basedow gebräuchlich, während im angelsächsischen die Krankheit Grave's Disease genannt wird. Der Morbus Basedow zeigt eine Prävalenz von bis zu 2% der Frauen, bei Männern ist er etwa zehnmalseltener [Dietel, 2003], wobei die Zahlen in einzelnen Bevölkerungsgruppen deutlich abweichen [McGrogan *et al.*, 2008]. Unter Patienten mit einer Hyperthyreose kann in 60-80% der Fälle ein Morbus Basedow als Ursache gefunden werden. Ein Altersgipfel unter den Neuerkrankungen lässt sich zwischen dem 20. und 50. Lebensjahr beobachten [Dietel, 2003].

Die starken Schwankungen in der Prävalenz bei verschiedenen Populationen deuten auf einen ausgeprägten Einfluss umweltbedingter Faktoren hin. Als solche beeinflussenden Faktoren wurden bisher die Aufnahme von hohen Dosen Jod, Stress, Allergien, Nikotinabusus und die Infektion mit Yersinien identifiziert [Prummel *et al.*, 2004]. Auch die Rolle von fetalen Zellen, die nach der Geburt in mütterlichem Gewebe antigene Eigenschaften (fetale Mikrochimärismen) besitzen [Ando *et al.*, 2002], wird diskutiert. Insgesamt lässt die deutliche Bevorzugung des weiblichen Geschlechts einen Einfluss der

Geschlechtshormone vermuten [Prummel *et al.*, 2004]. Ein familiär gehäuftes Auftreten und die Konkordanz bei Zwillingen und Geschwistern sprechen für den mitbestimmenden Einfluss der genetischen Faktoren [Ban und Tomer, 2005]. Auch für Morbus Basedow konnte der HLA-DR3-DQ2-Typ als Risikofaktor ausgemacht werden [Rapoport *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999]. Andere assoziierte Genloci sind CTLA 4 [Vaidya *et al.*, 2003] und PTPN22 [Velaga *et al.*, 2004; Criswell *et al.*, 2005], beide kodieren für T-Zell-regulatorische Proteine. Im IFIH1-Gen ist eine eindeutige Kopplung noch nicht belegt, Hinweise gibt es aber dafür [Sutherland *et al.*, 2007]. Schilddrüsen-spezifische Gene, wie das Tg-Gen und das TSH-Rezeptor-Gen, sind nahe liegende Ziele für die Suche nach prädisponierenden Veränderungen, da sie für die antigenen Strukturen kodieren. Im Tg-Gen sind SNPs mit deutlichen Assoziationen gefunden wurden, für Kopplungen im Gen des TSH-Rezeptors finden sich ebenfalls entsprechende Ergebnisse [Ban *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2003; Brand und Gough, 2010; Jacobson und Tomer, 2007b].

Bei Morbus Basedow Patienten sind Antikörper, die in der Schilddrüse an den Rezeptor für TSH binden und dort die Funktion des eigentlichen Hormons imitieren, für die Entwicklung einer Hyperthyreose verantwortlich. Der physiologische negative Rückkopplungseffekt der Hypophysen-Schilddrüsen-Achse fehlt und es kommt in Folge der vermehrten Produktion von Schilddrüsenhormon zur klinischen Ausprägung der Schilddrüsenüberfunktion. Typische Beschwerden sind starke Schweißneigung, Wärmeempfindlichkeit, gesteigerter Durst, Gewichtsabnahme, häufiger Stuhlgang, gesteigerte Erregbarkeit, Schlaflosigkeit, Palpitationen und verminderte Belastbarkeit. In der klinischen Untersuchung können Befunde wie eine Struma, feinschlägiger Fingertremor, warme und feuchte Hände, eine Tachykardie, eine erhöhte Blutdruckamplitude, Bewegungsunruhe oder Adynamie erhoben werden. Oft und gerade bei älteren Patienten werden mono- und oligosymptomatische Verläufe beobachtet [Nawroth, 2001]. Bei einem hohen Prozentsatz von 80% der Fälle spielen sich auch an der Orbita immunologische Prozesse ab, wo das Retrobulbärgewebe lymphozytär infiltriert wird und es durch eine Einlagerung

von Glykosaminoglykanen zu einer retrobulbären Verdickung und so zu einem Exophthalmus kommt. Diese endokrine Orbitopathie ist im Gegensatz zu den oben beschriebenen allgemeinen Symptomen einer Schilddrüsenüberfunktion typisch für eine Basedow-Hyperthyreose, tritt klinisch aber in nur 30% der Fälle in Erscheinung. Sie ist jedoch mit bildgebenden Verfahren wesentlich häufiger sichtbar zu machen [Nawroth, 2001].

Die Diagnose erfordert die Bestimmung des basalen TSH, das bei Vorliegen einer manifesten hyperthyreoten Stoffwechsellage bei erhöhtem fT3 und fT4 supprimiert ist. In über 95% der Fälle können die TSH-Rezeptorantikörper (TRAK) nachgewiesen werden [Berdel *et al.*, 2004]. Sonographisch zeigt sich in der Regel ein diffus echoarmes Bild der Schilddrüse, bei dopplersonographischer Untersuchung eine Hypervaskularisation. Eine Szintigraphie ist bei positivem Antikörperbefund nicht unbedingt erforderlich, eine diffus-homogene Erhöhung des Uptakes kann hier die Basedow-Hyperthyreose gegen fokale Autonomien abgrenzen. Histologisch erscheint die Schilddrüse entzündlich verändert mit diffuser lymphozytärer Durchsetzung und als Zeichen der gesteigerten Aktivität ist sie hyperplastisch und follikelreich.

Als therapeutische Option steht bei Neuerkrankung zunächst die thyreostatische Therapie mit initial 10-15 mg Thiamazol oder 15-20 mg Carbimazol im Vordergrund. Die Erhaltungsdosis, die nach Erreichen einer euthyreoten Stoffwechsellage benötigt wird, liegt meist zwischen 2,5-10 mg Thiamazol und 2,5-20 mg Carbimazol. Oft muss in der Einstellungsphase zusätzlich durch die Substitution mit L-Thyroxin das Abgleiten in die Hypothyreose verhindert werden. Die thyreostatische Therapie wird in der Regel für ein Jahr aufrecht erhalten, bevor ein Auslassversuch unternommen werden kann. Kommt es dann oder bereits unter der Therapie zu erneuter Hyperthyreose, werden ablativ Maßnahmen wie eine Radioiodtherapie oder die subtotale Resektion eingeleitet. Nach ablativen Maßnahmen ist weiterhin eine regelmäßige Kontrolle der Schilddrüsenparameter erforderlich, um die euthyreote Stoffwechsellage dauerhaft zu erhalten [Nawroth, 2001].

1.3.3 Morbus Addison

Der englische Arzt Thomas Addison beschrieb 1855 erstmals eine später nach ihm benannte Krankheit. Er beschrieb einen Krankheitszustand mit den Charakteristiken Anämie, generelle Mattigkeit und Kraftlosigkeit, eine deutliche Schwäche der Herzaktion und eine „seltsame Änderung der Hautfarbe“. Dieses klinische Bild stellte er in Zusammenhang mit einer Erkrankung der „Nebennierenkapseln“ [Addison, 1855].

In Europa beträgt die Inzidenz heute 4-6 Neuerkrankungen pro 1.000.000 Einwohner und Jahr, die Prävalenz liegt um die 100 Erkrankte pro 1.000.000 Einwohner. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt im 4. Lebensjahrzehnt [Arlt und Allolio, 2003].

Der Morbus Addison zeigt eine geringe familiäre Häufung. In Assoziations- und Transmissionsanalysen konnten verschiedene Genorte identifiziert werden, die die genetische Grundlage für das Auftreten des Morbus Addison bilden. Wie bei vielen Autoimmunerkrankungen sind mehrere Haplotypen im Bereich des HLA-Komplexes prädisponierend. So wurde für die Haplotypen DR3-DQ2 und DR4-DQ8 ein erhöhtes Risiko und für die heterozygote Kombination DR3-DQ2/DR4-DQ8 ein stark erhöhtes Risiko gefunden [Myhre *et al.*, 2002; Erichsen *et al.*, 2009]. Auch für Polymorphismen im CTLA-4-Gen wurden Assoziationen nachgewiesen [Kemp *et al.*, 1998; Donner *et al.*, 1997]. Bei vielen Patienten tritt der Morbus Addison nicht isoliert auf, sondern zeigt die Koinzidenz mit anderen Syndromen. So wird mit der Polyglandulären Insuffizienz Typ I (auch: Autoimmunes Polyglanduläres Syndrom I – APS1 oder „Autoimmune-Polyendocrineopathy-Candidiasis-Ectodermal-Dystrophy – APECED) das Auftreten von mindestens zwei der drei Krankheitsentitäten Morbus Addison, Hypoparathyreodismus und/oder chronische mukokutane Kandidiasis beschrieben. Dem APS1 liegt eine Mutation im AIRE-Gen auf Chromosom 21 zu Grunde und es wird autosomal-rezessiv vererbt [Kahaly, 2009]. Häufiger ist die Polyglanduläre Insuffizienz Typ II, bei der mit dem Morbus Addison eine Autoimmunthyreopathie (häufiger Hashimoto-Thyreoditis als Morbus Basedow), seltener auch ein T1D und/oder eine primäre Ovarialinsuffizienz auftritt. Diese

Krankheit ist mit den HLA-Typen HLA-B8 und HLA-DR3 in hohem Maße assoziiert. Neben diesen Risikoallelen im Bereich des HLA-Komplexes sind Allele im Bereich der CTLA-4 [Ueda *et al.*, 2003], PTPN22 [Siminovitch, 2004] und des TNF α -Gens [Dittmar *et al.*, 2009] beschrieben worden, die mit einem erhöhten Auftreten assoziiert sind. Der genaue ätiologische Hintergrund des autoimmunen Morbus Addison ist nicht vollständig bekannt. Bei 40-80% der an isoliertem Morbus Addison erkrankten Patienten können Autoantikörper gegen Nebennierenzellen (adrenocortical auto-antibodies – ACA) [Seissler *et al.* 1999; Falorni *et al.*, 2002] nachgewiesen werden, bei Vorliegen eines Polyglandulären Insuffizienzsyndroms gelingt der Nachweis häufiger. Autoantikörper gegen intrazelluläre Enzyme der Steroidbiosynthese, insbesondere gegen die 21-Hydroxylase, die 17 α -Hydroxylase und das Seitenkettenschneide-Enzym (side-chain-cleavage enzyme – SCC) können ebenfalls häufiger bei Patienten mit Polyglandulären Insuffizienzsyndromen gefunden werden.

Makroskopisch ist die Nebennierenrinde bei der Autoimmunadrenalitis deutlich atrophiert bei zumeist morphologisch unauffälligem Nebennierenmark. Im histologischen Bild findet sich eine Fibrose und Atrophie mit vermehrter lymphozytärer Infiltration. Sowohl autoreaktive B-Zellen als auch T-Zellen scheinen bei der Gewebsdestruktion eine Rolle zu spielen [Freeman und Weetman, 1992]. Diese hat zur Folge, dass die Produktion mineralocorticoider, glucocorticoider und androgener Hormone nicht in ausreichendem Maße erfolgt. Klinisch manifestiert sich die Insuffizienz erst bei einer Gewebsdestruktion von 90%. Elektrolytstörungen, eine auf ACTH-Stimulation inadäquat niedrige Cortisolantwort und erst spät ein kompensatorisch erhöhter ACTH-Plasmaspiegel sind diagnostische Hinweise. Bei fortgeschrittener Zerstörung treten Symptome wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit, diffuser Bauchschmerz, Gewichtsabnahme, Muskel- und Gelenkschmerzen, evtl. Fieber und Blutbildveränderungen als Folge des Glucocorticoidmangels auf. Im Rahmen der positiven Rückkopplung ist die ACTH-Sekretion gesteigert und es wird wegen der fehlenden Prozessierung in der Nebennierenrinde vermehrt Melanin gebildet. Das Hautkolorit sieht daher eher gut gebräunt denn blass aus, besonders in den Handlinien, an den Mamillen, an Narben und in den

Schleimhäuten treten Hyperpigmentierungen in Erscheinung. Die gestörte Produktion von Mineralocorticoiden führt zur Dysregulation des Salz- und Wasserhaushaltes mit Hyponatriämie, Hyperkaliämie, Dehydratation und arterieller Hypotonie mit orthostatischer Dysregulation. Nicht obligat und vorwiegend bei Frauen führt der adrenale Androgenmangel zum Verlust der sekundären Geschlechtsbehaarung, zu trockener und rauher Haut, zum Libidoverlust und zu psychischen Veränderungen. Zu einer Addison-Krise kann es besonders in physischen Stresssituationen kommen. Sie äußert sich durch eine Schocksymptomatik, Exsikkose, Pseudoperitonitis, Hypoglykämie, Fieber und Bewußtseinsstörungen bis hin zum Koma. In einer solchen Krise ist die primäre Nebenniereninsuffizienz potentiell lebensbedrohend. Bei klinischem Verdacht auf einen Morbus Addison erfolgt die Bestimmung des morgendlichen Serumcortisols (die Cortisolsekretion unterliegt einer starken zirkadianen Rhythmik). Ist dieser Wert niedriger als 5µg/dl, so erhärtet das den klinischen Verdacht. Zur Sicherung der Diagnose dient der ACTH-Stimulationstest. Auf die intravenöse Gabe von 250 µg Synacthen sollte das Serumcortisol 60 Minuten nach Injektion auf >20 µg/dl angestiegen sein. Ist vor dem Test der Serumcortisolwert bereits > 20 µg/dl, so wird ein Anstieg um > 5 µg/dl als Ausdruck einer ausreichenden Funktionsreserve akzeptiert. Bei der Diagnose Morbus Addison sollte immer auch das Screening auf weitere Autoimmunerkrankungen erfolgen, um ein mögliches Polyglanduläres Syndrom zu erkennen.

Die Therapie besteht in der Substitution von Gluco- und Mineralocorticoiden. Die Substitution von Androgenen gehört zur Zeit nicht zur Standardtherapie. Die Dosierung liegt meist bei 15-20 mg/Tag Hydrocortison (z.B. 10-5-0) und 0,5-1 mg Fludrocortison. Auf eine angemessene Dosisanpassung in Stresssituationen muss geachtet werden [Nawroth, 2001].

1.4 Fragestellung

Autoimmunerkrankungen sind Krankheiten, bei denen die Mechanismen der Selbsttoleranz versagen. Sie entstehen durch ein Zusammenspiel zwischen genetischer Prädisposition und äußeren Faktoren. Zu den genetischen Faktoren, die bei der Pathogenese eine Rolle spielen, gehören die Gene des HLA-Systems, der CTLA-4-Genort und das Gen PTPN22 [Huber *et al.*, 2008]. In den letzten Jahren wurden daneben Assoziationen zwischen dem IFIH1-Genlocus (SNP rs1990760) und T1D und Morbus Basedow gefunden [Smyth *et al.*, 2006; Sutherland *et al.* 2007]. Das IFIH1-Gen ist lokalisiert auf Chromosom 2q24 und kodiert für eine Rezeptorhelicase des angeborenen Immunsystems: IFIH-1 fungiert als ein intrazellulärer Sensor für zytoplasmatisch vorhandene Virusnukleinsäuren (dsRNA) und stößt über die Aktivierung von IRF-3 und NF- κ B die IFN- β -Produktion an. Unangemessene Aktivierung der virussensitiven Helicase durch körpereigene intrazelluläre Nukleinsäuren könnte zu einer Dysregulation des inflammatorischen Interferonsystems führen und so die Toleranz gegenüber körpereigenen Zellen schon auf der Ebene des angeborenen Immunsystems verloren gehen [Stetson *et al.*, 2006]. Die Frage, ob der IFIH1-Polymorphismus rs1990760 im genetischen Hintergrund anderer Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielt, stand im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Es wurden daher Genotyp- und Allelfrequenzen bei deutschen Patienten mit Morbus Basedow, Hashimoto-Thyreoditis, Morbus Addison und gesunden Kontrollen untersucht. Mit Hilfe des Transmission-Disequilibrium-Tests (TDT) wurden Familien hinsichtlich dieses Polymorphismus untersucht, in denen ein Kind von Hashimoto-Thyreoditis oder Morbus Basedow betroffen ist. Die Hashimoto-Familien stammten aus Italien, die Morbus-Basedow-Familien aus Deutschland. Darüber hinaus wurde die Verteilung des IFIH1-rs1990760-Polymorphismus in Familien- und Fall-Kontroll-Untersuchungen im Zusammenhang mit An- und Abwesenheit des HLA-Risiko-Haplotyps DQ2 und des Risikohaplotypen DQ2/DQ8 analysiert. Außerdem wurde der Schilddrüsenantikörperstatus in die Untersuchungen mit einbezogen.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten, Familien und Kontrollpersonen

Die Studienpopulation der Fall-Kontroll-Analysen bestand aus Patienten mit Morbus Basedow, Hashimoto-Thyreoditis und Morbus Addison. Als Kontrollen dienten freiwillige gesunde Kontrollpersonen ohne eine Familienanamnese für Autoimmunerkrankungen, rekrutiert wurden sie unter Angestellten und Medizinstudenten der Universitätsklinik Frankfurt am Main. Die untersuchte Population der Familienanalysen bestand aus jeweils einem betroffenen Abkömmling sowie dessen Eltern. Zur genaueren Charakterisierung der untersuchten Proben dient die folgende Tabelle:

Tabelle 2: Patienten und Kontrollen - Herkunft, Alter und Anzahl

	Herkunft der Proben	Alter der Patienten Median (Bereich)	Anzahl der Proben (gesamt)	Anzahl der Proben (weiblich)	Anzahl der Proben (männlich)
Morbus Addison	<u>Deutschland</u> Düsseldorf, Berlin Frankfurt am Main, Freiburg, München, Mannheim, Erlangen, Würzburg	51 (19-87)	195	138	57
Hashimoto-Thyreoditis	<u>Deutschland</u> Frankfurt am Main, Berlin, Freiburg, Mannheim	37 (22-70)	106	87	19
Morbus Basedow	<u>Deutschland</u> Frankfurt am Main, Mannheim, München, Freiburg, Düsseldorf	45 (7-80)	258	207	51
Kontrollen	<u>Deutschland</u> Frankfurt am Main	42 (30-101)	227	160	67

Tabelle 3: Familien - Herkunft, Alter und Anzahl

	Herkunft der Proben	Alter des Betroffenen Median (Bereich)	Anzahl der Familien
Hashimoto-Thyreoditis	<u>Italien</u> Rom	11 (2-21)	149
Morbus Basedow	<u>Deutschland</u> Düsseldorf, Frankfurt am Main, München, Mannheim	43 (26-55)	59

Die Diagnosestellung erfolgte jeweils nach den WHO-Kriterien für Morbus Addison, Morbus Basedow und Hashimoto-Thyreoditis.

Zur Erhebung und Verwertung ihrer klinischen und genetischen Daten zu wissenschaftlichen Zwecken gaben alle untersuchten Individuen ihr Einverständnis.

Das Studienprotokoll wurde der Ethikkommission des Universitätsklinikums Frankfurt am Main vorgelegt und genehmigt.

2.2 Untersuchung auf IFIH1-Polymorphismus rs1990760

Das IFIH1-Gen, lokalisiert auf Chromosom 2q24.3, wurde auf den Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (SNP) rs1990760 untersucht. Die Genotypisierung erfolgte in einem ABI 7300 real-time-PCR-System unter Verwendung des Taqman-Assays C_2780299_30.

Der Polymorphismus rs1990760 ist ein nicht-synonymer SNP, der zu einem Alanin zu Threonin Aminosäureaustausch im Codon 946 (A946T) des für die Helicase kodierenden IFIH1-Gens führt.

2.3 Materialien

2.3.1 Geräte, Gefäße und Zubehör

Artikel	Bezugsquelle
Autoklav	Tuttnauer, Breda (NL)
Agarose-Elektrophorese-Apparatur	Renner, Dannstadt (D)
Agarose-Gelkammer	Renner, Dannstadt (D)
Deckelkette für 0,2 ml Kette	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Eppendorf UVette	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Falcon-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen (D)
Gefrierschränke (-20°C)	Bosch, Stuttgart (D) und AEG, Nürnberg (D)
Gefrierschranke (-80°C)	Heraeus Sepatech, Hanau (D)
GeneQuant pro	AmershamBiosciences, Cambridge (UK)
Glaspipette	Greiner, Frickenhausen (D)
GPR-Zentrifuge	Beckmann, Fullerton (CA, USA)
Kühlschränke (+4°C)	Liebherr, Biberach an der Riß (D) und Bosch, Stuttgart (D)
Leukosilk	Beiersdorf, Hamburg (D)
Mikrowelle	AEG, Nürnberg (D)
Mikrofuge-E-Tischzentrifuge	Beckman, Fullerton (CA, USA)
Selbstklebende Versiegelungsblätter, optisch geklärt	ABGene, Epsom (UK)
Pipetten	Eppendorf, Hamburg (D)
Pipettenspitzen	Starlab GmbH, Ahrensburg (D)
Polaroid-Filme 667	Polaroid, Cambridge (MA, USA)
Polaroid-Sofortbildkamera	Polaroid, Cambridge (MA, USA)
Präzisionswaage LC 620 S	Sartorius, Göttingen (D)

Material und Methoden

7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt (D)
Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht (D)
UV-Transilluminator	PeQLabBiotechnologie, Erlangen (D)
Thermocycler PTC-200	MJ Research, Las Vegas (NV, USA)
Thermo-Fast 96 Detection Plate	ABGene, Epsom (UK)
Thermo-Strip 0,2 ml	ABGene, Epsom (UK)
Vortex-Gerät DSG 302	Heidolph, Kelheim (D)
Wasserbad SW-21C	Julabo, Allentown (PA,USA)

2.3.2 Chemikalien

Artikel	Bezugsquelle
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen (D)
Bromphenolblau	USB, Cleveland (OH, USA)
BSA	PharmaciaBiotech, Uppsala (S)
dNTPs	Boehringer, Mannheim (D)
EDTA	Roth, Karlsruhe (D)
Essigsäure	Merck, Darmstadt (D)
Ethanol (70%ig)	Riedel de Haen, Seelze (D)
Ethanol (96%ig)	Riedel de Haen, Seelze (D)
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim (D)
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt (D)
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt (D)
DNA-Molekulargewichtsmarker VIII	Boehringer, Mannheim (D)
DNA-Molekulargewichtsmarker XIV	Boehringer, Mannheim (D)
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe (D)
Na ₂ EDTA	Carl Roth GmbH &Co,

Material und Methoden

Nonidet P40	Karlsruhe (D)
Saccharose	AppliChem, Darmstadt (D)
Salzsäure	Merck, Darmstadt (D)
SDS	Merck, Darmstadt (D)
SYBR Green I Nucleinsäure-Farbgel	Boehringer, Mannheim (D)
Tris	RocheDiagnostics, Indianapolis (IN, USA)
Tris-HCl	Boehringer, Mannheim (D)

2.3.3 Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
5x Colorless GoTaq® Flexi Buffer	
dNTP-Mix (10x)	2 mM dATP 2 mM dCTP 2 mM dGTP 2 mM dTTP
Ladepuffer (5x)	50 mM Tris-HCl (pH 7,6) 50 mM EDTA 0,5% SDS 0,1% Bromphenolblau 40% Saccharose
Nonidet-Puffer	0,1 % Nonidet P40 0,9 % NaCl steriles destilliertes Wasser ad 2000 ml

Material und Methoden

Proteinase-K-Lösung	Proteinase K 500 mg in 50 ml H ₂ O
SDS-Lösung (20%w/v)	20%w/v Natriumdodecylsulfat steriles destilliertes Wasser ad 1000 ml
SE-Puffer	75 mM NaCl 25 mM Na ₂ EDTA steriles destilliertes Wasser ad 1000 ml auf pH 8,0 einstellen
TAE-Puffer (1x)	200 mL 50x konzentrierter TAE- Puffer ad 10 l bidestilliertes Wasser
TAE-Puffer (50x)	2 M Trisbase 0,1 M EDTA (wasserfrei) 114 mL 1 M Eisessig auf pH 8,5 einstellen
TaqMan® Universal PCR Master Mix	
TEA-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA steriles destilliertes Wasser ad 1000 ml auf pH 8,0 einstellen

2.3.4 Sonden

Die Sonde für die Durchführung der Real-Time-PCR wurde von Applied Biosystems, Darmstadt (D), bezogen.

Polymorphismus	Sequenz/Assay-Nummer	Quencher	Reporter	Allel
IFIH1 rs1990760 (A946T)	C__2780299_30	TAMRA	VIC	G
			FAM	A

2.3.5 Software

Die generierten Daten wurden auf handelsüblichen Computern unter Windows XP® (Microsoft, Redmond, WA, USA) verarbeitet. Die Datenbankprogramme und Access 2004® (Microsoft, Redmond, WA, USA) wurden zur Speicherung und zur Subgruppenauswertung verwendet. Der Transmission-Disequilibrium-Test (TDT) und der χ^2 - Test wurden mit Hilfe des Softwarepakets BiAS (Version 9.07, Epsilon, Weinheim, Deutschland) durchgeführt. Die Haplotypen, SNP's und das linkage disequilibrium (LD) wurden mit der Software Haploview, (Version 3.2, erhältlich unter <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>) analysiert. Korrelationen mit HLA-Risiko-Allelen wurden mit Hilfe der Software Unphased (Version 2.403, erhältlich unter <http://www.rfcgr.mrc.ac.uk/fdudbrid/software/unphased>) beurteilt.

2.4 Methoden

2.4.1 DNA-Isolierung mit der Aussalzmethode

Eine schnelle und sichere Methode, um DNA aus Vollblut zu extrahieren, wurde 1988 von Miller und Dykes entwickelt. Sie beinhaltet das Aussalzen der zellulären Proteine in einer gesättigten NaCl-Lösung [Miller *et al.* 1988].

Durch Zentrifugation bei 4 °C werden dabei zunächst die kernhaltigen Zellen aus der Masse der Erythrozyten abgeschieden. In mehreren Waschungen mit Nonidet 0,1%iger Lösung, einem nichtionischen Detergens, werden die Leukozyten aus dem EDTA-Blut separiert.

Um die DNA aus den Zellen zu erhalten, wird das Leukozytenpellet über Nacht bei 37 °C in einer Lösung aus 5 ml SE-Puffer, SDS-Lösung und Proteinase K inkubiert.

Nach dem kompletten Verdau durch die Proteinase wird dem Ansatz am nächsten Tag 3 ml 5M-NaCl-Lösung hinzugegeben. Nach guter Durchmischung und 20 min. Inkubationszeit bei 52 °C erfolgt die Zentrifugation bei 1780 g in Raumtemperatur. Dabei scheidet sich ein Protein-Pellet am Boden ab. Der Überstand mit der durch den Verdau freigewordenen DNA wird in ein sauberes Röhrchen überführt und mit dem doppelten Volumen 96%igem Ethanol versetzt. Nach gutem Schütteln bildet sich ein DNA-Knäuel, das mit einer Glas-Pasteurpipette herausgefischt werden kann.

Nach kurzem Waschen in einem Bad mit 70%igem Ethanol wird das Knäuel nun an der Luft getrocknet und dann in 50-300 µl TE-Puffer gelöst. Anschließend kann die photometrische Konzentrationsbestimmung der gewonnenen DNA erfolgen. Die extrahierte DNA ist bei -20°C mehrere Jahre lang haltbar.

2.4.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der extrahierten und in Puffer gelösten DNA wurde photometrisch bestimmt. Da Wasser und Puffer dieselbe optische Dichte aufweisen, konnte Wasser als Eichlösung verwendet werden. Die Lichtabsorption durch die Probe wurde mit der Absorption durch Wasser verglichen und aus dem Absorptionsunterschied die Konzentration der DNA-Probe berechnet. Da Nukleinsäuren bei 260 nm ein Absorptionsmaximum aufweisen, wurde diese Wellenlänge zur Messung verwendet. Die Messungen erfolgten in 1:10 verdünnten Proben (5 µl der DNA-Probe auf 45 µl H₂O).

2.4.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist es möglich, DNA-Bereiche beliebig zu vervielfältigen. Es werden sog. Primer benötigt, die den Bereich auf der DNA umgeben, der amplifiziert werden soll. Millionenfache Kopien der Ziel-DNA können hergestellt werden, wenn man die umgebende Sequenz der Primerregionen kennt.

Primer sind synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die typischerweise aus 20-30 Basenpaaren bestehen. Sie sind komplementär zu jeweils einem DNA-Strang und binden somit spezifisch an die die Ziel-DNA umgebenden Bereiche.

Um die Reaktion stattfinden zu lassen, werden folgende Komponenten benötigt: Ein Primerpaar, das mit dem die Ziel-DNA umgebenden Bereich hybridisiert, eine thermostabile Polymerase, die die Kopien synthetisiert und alle vier Desoxyribonukleotid-Triphosphate, aus denen die kopierten DNA-Stücke dann bestehen.

Jeder PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten: der Denaturierung, der Anlagerung und der Elongation.

Zunächst wird die Doppelstrang-DNA durch Erhitzen auf 95 °C in zwei Einzelstränge getrennt (denaturiert). Die Temperatur ist entscheidend, da zu

große Hitze die Matrize zerstört, zu niedrige Temperatur aber nicht ausreicht, um zu gewährleisten, dass nur noch Einzelstrang-DNA vorliegt.

In der zweiten Phase, der Anlagerungsphase, wird das Reaktionsgemisch abrupt auf die für die Primer optimale Anlagerungstemperatur abgekühlt, um den Primern zu ermöglichen, sich an ihre jeweils komplementären Sequenzen anzulagern. Die optimale Anlagerungstemperatur, auch Annealingtemperatur genannt, ist abhängig von dem prozentualen Anteil von Purin zu Pyrimidinbasen in der Sequenz und wird durch Austesten verschiedener Temperaturen ermittelt. Die Einhaltung der Temperatur ist auch hier wichtig. Eine zu hohe Temperatur in dieser Phase verhindert, dass sich die Primer vollständig an die Matrize anlagern, während eine zu niedrige Anlagerungstemperatur Bindungen der Primer an nicht-komplementäre DNA-Abschnitte ermöglicht und damit die Spezifität der PCR verringert.

Die Primersequenzen sind so gewählt, dass sich der eine Primer an das 3'-Ende des einen Zielstranges anlagert, der andere Primer an das 3'-Ende des komplementären Elternstranges. Durch einen großen Überschuss an Primern wird verhindert, dass sich erneut Eltern-DNA-Stränge bilden. Bei der Primerauswahl wird zudem darauf geachtet, dass die Enden nicht komplementär zueinander sind, um die Bildung von Primerdimeren zu vermeiden.

Im nächsten Schritt, dem Synthese-Schritt, führt die Erhöhung der Temperatur auf 72 °C dazu, dass die Taq-Polymerase arbeiten kann. Die Taq-Polymerase ist ein Enzym, das ursprünglich aus dem thermostabilen Bakterium *Thermophilus aquatus* stammt und ausgehend von den Primern den Strang komplementär zur Matrize aus den zugegebenen Nukleotiden verlängert. Der gesamte Vorgang kann allein durch das zyklische Ändern der Temperatur wiederholt werden.

Nach n Wiederholungen steigt die Menge der Ziel-DNA auf 2^n an. Die neuen Stränge, die nach einigen Zyklen nur noch aus der Zielsequenz plus angelagerter Primersequenz bestehen, dienen im nachfolgenden ebenfalls als Matrize für erneute Syntheseschritte.

Konzentrationsabhängig wird die Taq-Polymerase durch die Endprodukte gehemmt, daher sind nicht unendlich viele Zyklen durchführbar. Während im

ersten PCR-Zyklus nur Amplifikate nicht definierter Länge entstehen, werden ab dem zweiten Zyklus auch Amplifikate (durch die Positionen der beiden Primer) definierter Länge synthetisiert. Die Anzahl der Produkte definierter Länge wächst im Laufe der PCR exponentiell, während die Anzahl der Produkte nicht definierter Länge nur linear wächst und damit nach wenigen Zyklen verschwindend gering ist.

Zur Optimierung der PCR-Ansätze werden diese bezüglich der Anlagerungstemperatur variiert, bis die jeweils günstigsten Bedingungen gefunden ist. Bei jeder durchgeführten PCR wird eine Negativkontrolle, die alle Bestandteile außer der Template-DNA enthielt, mitgeführt.

2.4.4 HLA-Typisierung durch PCR mit Sequenz-spezifischen Primern

Die PCR mit Sequenz-spezifischen Primern (SSP) beruht auf dem Prinzip, dass nur Oligonukleotid-Primer, deren Sequenz vollständig komplementär zur Zielsequenz der Test-DNA sind, an diese DNA binden und ein Amplifikat erzeugen. Die Bedingungen der PCR müssen bei diesem Verfahren für die jeweiligen Primer genau passend gewählt werden, um unspezifische Amplifikationen zu verhindern.

Nicht komplementäre Primer hingegen hybridisieren nicht, es findet keine Amplifikation statt. Der Nachweis von spezifisch amplifizierter DNA erfolgt durch Agarosegelelektrophorese nach Anfärbung mit Ethidiumbromid.

Die Sequenzen der Primer zur HLA-Typisierung waren folgende:

DQA1:

DQA1*0101	P1	5'CATGAATTTGATGGAGATGAGG'3 (22)
	P2	5'ATGATGTTCAAGTTGTGTTTTTGC'3 (23)
		149Bp

Material und Methoden

DQA1*0102/3	P1	5'CATGAATTTGATGGAGATGAGC'3 (22)
	P2	5'ATGATGTTCAAGTTGTGTTTTTGC'3 (23)
		149 Bp
DQA1*0103	P1	5'ACGGTCCCTCTGGCCAGTT'3 (19)
	P2	5'ATGATGTTCAAGTTGTGTTTTTGC'3 (23)
		172 Bp
DQA1*0201	P1	5'ACGGTCCCTCTGGCCAGTT'3 (19)
	P2	5'CAGGATGTTCAAGTTATGTTTTAG'3 (24)
		170 Bp
DQA1*0301/2	P1a	5'TTCACTCGTCAGCTGACCAT'5 (20)
	P1b	5'TTCACTCGTCAGCTGACCAC'5 (20)
	P2	5'CAAATTGCGGGTCAAATCTTCT'3 (22)
		183 Bp
DQA1*0401	P1	5'ACCCATGAATTTGATGGAGAC'3 (21)
	P2	5'CACATACCATTGGTAGCAGCA'3 (21)
		190 Bp
DQA1*0501	P1	5'ACGGTCCCTCTGGCCAGTA'3 (19)
	P2	5'AGTTGGAGCGTTTAATCAGAC'3 (21)
		186 Bp
DQA1*0601	P1	5'ACGGTCCCTCTGGCCAGTT'3 (19)
	P2	5'GGTCAAATCTAAATTGTCTGAGA'3 (23)
		117 Bp

Für DQA1 *0301/2 wurden die Primer P1a und P1b 50:50 gemischt.

DQB1:

DQB1*0201	P1	5'GTGCGTCTTGTGAGCAGAAG'3 (20)	
	P2	5'GCAAGGTCGTGCGGAGCT'3 (18)	
			205 Bp
DQB1*0201/*0302	P1	5'GACGGAGCGCGTGCGTCT'3 (18)	
	P2	5'CTGTTCCAGTACTCGGCGG'3 (19)	
			129 Bp
DQB1*0302/*0303	P1	5'GACGGAGCGCGTGCGTCT'3 (18)	
	P2	5'AGTACTCGGCGTCAGGCG'3 (18)	
			122 Bp
DQB1*0303	P1	5'GACGGAGCGCGTGCGTCT'3 (18)	
	P2	5'CTGTTCCAGTACTCGGCGT'3 (19)	
			129 Bp
DQB1*0401	P1	5'CACCAACGGGACCGAGCT'3 (18)	
	P2	5'GGTAGTTGTGTCTGCATACG'3 (20)	
			200 Bp
DQB1*0402	P1	5'CACCAACGGGACCGAGCG'3 (18)	
	P2	5'GGTAGTTGTGTCTGCATTACG'3 (20)	
			200 Bp
DQB1*0501	P1	5'CGGAGCGCGTGCGGGG'3 (16)	
	P2	5'GCTGTTCCAGTACTCGGCAA'3 (20)	
			128 Bp

Material und Methoden

DQB1*0502	P1	5'TGCGGGGTGTGACCAGAC'3 (18)	
	P2	5'TGTTCCAGTACTCGGCGCT'3 (19)	
			117 Bp
DQB1*0503	P1	5'TGCGGGGTGTGACCAGAC'3 (18)	
	P2	5'GCGGCGTCACCGCCCGA'3 (17)	
			123 Bp
DQB1*0601	P1	5'GCCATGTGCTACTTCACCAAT'3 (21)	
	P2	5'CACCGTGTCCAACCTCCGCT'3 (19)	
			198 Bp
DQB1*0602	P1	5'CGTGCGTCTTGTGACCAGAT'3 (20)	
	P2	5'GCTGTTCCAGTACTCGGCAT'3 (20)	
			121 Bp
DQB1*0603	P1	5'GGAGCGCGTGCGTCTTGTA'3 (19)	
	P2	5'GCTGTTCCAGTACTCGGCAT'3 (20)	
			127 Bp
DQB1*0604	P1	5'CGTGTACCAGTTTAAGGGCA'3 (20)	
	P2	5'GCAGGATCCCGCGGTACC'3 (18)	
			254 Bp
Kontrolle:	P1	5'TGCCAAGTGGAGCACCCAA'3 (19)	
	P2	5'GCATCTTGCTCTGTGCAGAT'3 (20)	
			796 Bp

Tabelle 4: Reaktionsgemisch und -bedingungen der PCR-SSP

PCR-Ansatz für die SSP-PCR	Reaktionsbedingungen
2,0 µl DNA-Template (20 ng/µl)	1) Denaturierung bei 94°C für 4 Min.
2,0 µl dNTPs	2) Denaturierung bei 94°C für 30 Sek.
4,0 µl PCR-Puffer Go Taq Flexi	3) Primeranlagerung bei 65°C für
1,0 µl Kontrollprimer 1 (5 pM)	45 Sek.
1,0 µl Kontrollprimer 2 (5 pM)	4) Elongation bei 72°C für 30 Sek.
1,0 µl Sequenz-spezifischer	5) 29 Wiederholungen der Schritte
Primer 1 (sense; 25 mM)	2 bis 4
1,0 µl Sequenz-spezifischer Primer	6) abschließender Syntheseschritt bei
2 (antisense; 25 mM)	72 °C für 4 Min.
0,25 µl Taq-Polymerase Go Taq	7) Kühlung auf 10 °C
(5 U/µl)	
1,5 µl MgCl ₂ (25 mM, Promega)	
6,25 µl Aqua dest.	

Die Typisierungen der HLA-Gruppen B1 wurde zunächst vom Blutspendedienst Frankfurt am Main mit dem Dynal RELI SSO HLA-DRB Test durchgeführt.

2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Grundprinzip aller elektrophoretischen Methoden ist die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld zur Elektrode umgekehrter Polarität. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von Porengröße, Molekülgröße, ihrer Ladung und der Feldstärke ab.

Nukleinsäuren tragen bei neutralem pH-Wert wegen ihrer Phosphatgruppen eine stark negative Ladung. Daher wandern DNA- und RNA-Moleküle im elektrischen Feld zur Anode. Kleinere Moleküle wandern dabei schneller durch die Gelmatrix als große, so dass sie nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die

zurückgelegte Strecke ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts der jeweiligen Nukleinsäure [Helling *et al.*, 1974].

Die Matrix des Gels verhindert eine zufällige Diffusion der Moleküle im Gel, so dass Moleküle mit derselben Länge gleich schnell wandern und eine Bande formen. Die Breite der Banden entspricht dabei der Breite der Taschen im Gel, in die man die Probe gegeben hat.

Die Größe der Nukleinsäuremoleküle einer Bande kann durch den Vergleich mit der Wanderungstrecke von Molekülen bekannter Größe abgeschätzt werden.

DNA-Moleküle bis zu einer Größe von 2000 Nukleotiden werden in der Regel in Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt, Agarose-Gele eignen sich für die Auftrennung von DNA-Molekülen mit einer Länge zwischen 500 Nucleotiden und 20 kb.

Es gibt zwei gängige Methoden, um die entstehenden Banden im Gel sichtbar zu machen. Entweder wird radioaktiv markierte DNA verwendet oder das Gel wird mit dem fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid versetzt. Dabei lagert sich das planare Molekül Ethidiumbromid zwischen den Basenpaaren an, es interkaliert. An der Stelle also, an der sich ein Großteil des Farbstoffs Ethidiumbromid befindet, liegt auch die DNA hochkonzentriert vor. Beleuchtet man nun das Gel mit ultraviolettem Licht, fluoreszieren die Bereiche, die DNA enthalten, sehr viel heller als die Umgebung und die Banden werden sichtbar.

In der vorliegenden Arbeit betrug die Agarose-Konzentration im Gel 3%, zur Anfärbung der Gels wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 5 µl pro 100 ml Gelansatz verwendet. Als Platzhalter für die Geltaschen dienten Käbme, die beim Gießen in den Schlitten gehängt wurden. Nach dem Erstarren des gegossenen Gels wurden in die entstandenen Taschen die mit Ladepuffer versetzten Proben aufgetragen und eine Spannung von 120 Volt angelegt. Die Lauffront war durch das im Ladepuffer enthaltene Bromphenolblau sichtbar. Ein mitlaufender Marker mit definiertem Molekulargewicht diente als Referenz für die Auswertung. Der Lauf erfolgte in einfach konzentriertem TAE-Puffer. Die Auswertung wurde in einem UV-Transilluminator bei 254 nm Wellenlänge durchgeführt und mit einer Polaroid-Sofortbildkamara fotografisch dokumentiert.

2.4.6 Real-Time-PCR

Die Methode der Real-Time-PCR (RT-PCR) beruht, wie die konventionelle PCR, auf mehreren einander folgenden Zyklen von Denaturierung, Anlagerung und Elongation. Sie ermöglicht über die zur Amplifizierung von DNA hinaus die Unterscheidung von heterozygoten und homozygoten Zellen, also die Genotypisierung.

Die Unterscheidung, ob eine Zelle für ein bestimmtes Allel hetero- oder homozygot ist, wird durch die Verwendung von allelspezifischen Sonden ermöglicht. Die gelelektrophoretische Auftrennung ist also nicht mehr notwendig.

Wie bei der konventionellen PCR werden zwei Primer für die Amplifikation des Genproduktes benötigt. Zusätzlich enthält der Ansatz bei der RT-PCR zwei für die beiden Allele spezifische DNA-Sonden. Deren Basensequenz ist komplementär zu den DNA-Abschnitten, in denen die zu untersuchenden Polymorphismen liegen.

2.4.7 Genotypisierung von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) mit dem RT-PCR-Verfahren

Die Sonden, die jeweils genau komplementär zu dem den Polymorphismus enthaltenden Strang sind, sind zweifach Fluoreszenz-markiert. Sie tragen einen Reporterfarbstoff (allelspezifisch VIC oder FAM) am 5'-Ende und einen Quencher-Farbstoff am 3'-Ende (TAMRA). Der Reporterfarbstoff wird, wenn er in räumlicher Nähe des Quencherfarbstoffes liegt, von diesem unterdrückt. Die Taq-Polymerase besitzt, neben ihrer den Strang aufbauenden Funktion, eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, die die Sonde während der Strangsynthese degradiert. So entsteht ein räumlicher Abstand zwischen den Farbstoffen; die Intensität der Reporterfluoreszenz nimmt zu. Das emittierte Licht wird von einem Detektor aufgenommen und vom Gerät in eine graphische Darstellung umgewandelt.

Durch die allelspezifische Farbstoffmarkierung der Sonden ist es möglich, anhand der Fluoreszenz die Genotypen der Proben zu erkennen. Wird nur ein Farbstoff detektiert, ist die Probe homozygot für das jeweilige Allel, wird ein Anstieg beider Farbstoffe verzeichnet, liegt ein heterozygoter Genotyp vor.

Tabelle 5: Pipettieransatz für die RT-PCR

Pipettieransatz für die RT-PCR:
3,0 µl DNA (20 ng/µl)
6,25 µl TaqMan Universal PCR Master Mix
0,3 µl Sonde
15,45 µl H ₂ O

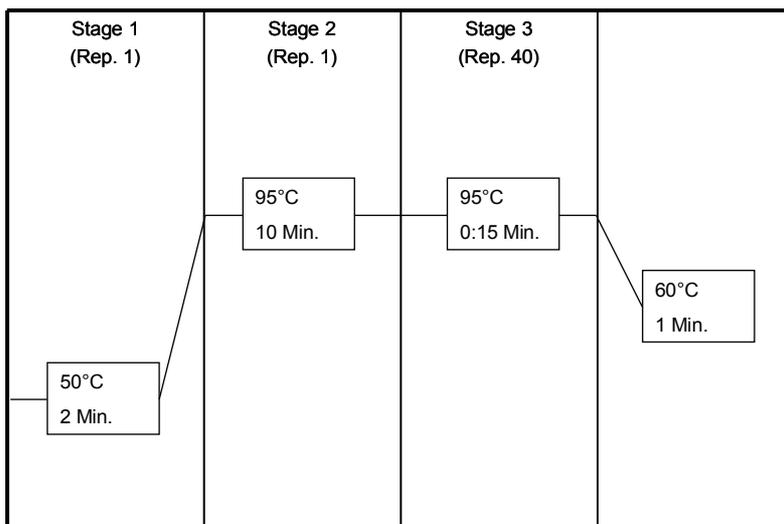


Abbildung 3: Temperaturschema der RT-PCR

2.4.8 Bestimmung der Thyreoperoxidase-, Thyreoglobulin- und TSH-Rezeptor-Antikörper

Die Bestimmung der Thyreoperoxidase-Antikörper (TPO-Ak) und der Thyreoglobulin-Antikörper (Tg-Ak) erfolgte durch einen Enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA). Das System zur Durchführung stammt von

Phadia, Freiburg (D). Die TSH-Rezeptor-Antikörper (TRAK) wurden mit dem TRAK- Bestimmungssset von Brahms, Berlin (D), bestimmt.

Als Ak-positiv gewertet wurden Patienten, die Werte oberhalb der folgenden Grenzen aufwiesen:

TPO-Ak: 100 UI/ml

Tg-Ak: 100 UI/ml

Trak: 1 UI/l

Bei den Familienanalysen der Hashimoto-Familien wurden die Eltern nach ihrem Antikörperstatus in Gruppen aufgeteilt. Als Ak-positiv wurden hier Eltern eingestuft, deren Ak-Titer das doppelte des oberen Normalwertes betragen (TPO-Ak > 40 IU/ml bei einem Normalwert von 20 IU/ml und Tg-Ak > 100 IU/ml bei einem Normalwert von 50 IU/ml).

2.4.9 Indirekte Haplotypisierung

Mit Hilfe molekulargenetischer Verfahren wird die Anwesenheit von Allelen im diploiden Chromosomensatz nachgewiesen. Eine Aussage darüber, wie diese Allele auf den beiden homologen Chromosomen eines für mindestens zwei Polymorphismen heterozygoten Individuums verteilt sind, kann jedoch nicht getroffen werden. Ist der Genotyp eines diploiden Individuums AaBb, so kann der zugrunde liegende Haplotyp entweder ABab oder AbaB sein. Der Haplotyp ABab bedeutet, dass das eine Chromosom die Allele A und B besitzt, das andere die Allele a und b. Ist der Haplotyp AbaB, so besitzt das eine Chromosom die Allele A und B, das andere a und B. Soll ein Vererbungsgleichgewicht untersucht werden, ist die Information über die genaue Konstellation, in der die einzelnen Allele vererbt wurden, von entscheidender Bedeutung. Zur Ermittlung des Haplotyps einer „unklaren“ Person kann die genetische Information anderer Familienmitglieder herangezogen werden. Die „unklare“ Person wird indirekt haplotypisiert.

Ein Beispiel soll dies verdeutlichen: Bei einem Patienten mit dem Genotyp „AaBbCCdd“ sind z.B. sowohl die Haplotypenkombinationen „abCd/ABCd“ als auch „AbCd/aBCd“ möglich. Bei einem mütterlichen Genotyp „AabbCCdd“ ergeben sich hieraus eindeutig ihre Haplotypen „AbCd/AbCd“. Sie kann in diesem Fall nur den Haplotyp „AbCd“ vererben, und es lassen sich aus diesen Informationen die Haplotypen des Kindes herleiten. Durch die indirekte Haplotypisierung und die dadurch mögliche Unterscheidung, ob ein Merkmal vom Vater oder von der Mutter vererbt wurde, kann die Vererbungsconstellation in die statistische Evaluation einfließen. In Abbildung 4 ist dieser Zusammenhang schematisch dargestellt:

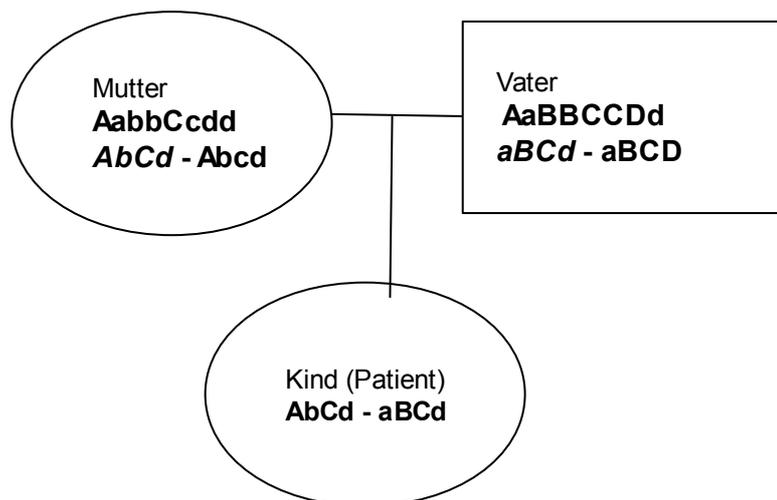


Abbildung 4: Indirekte Haplotypisierung

Es werden die vererbten und die nicht vererbten Allele gezeigt. Daraus lässt sich die Herkunft eines bestimmten Merkmals auf einen der Elternteile zurückführen.

2.4.10 Konditionierung und Subgruppenbildung

In Untersuchungen von Risikofaktoren für Erkrankungen, die multifaktoriell vererbt werden, haben die einzelnen bei der Pathogenese eine Rolle spielenden Faktoren in unterschiedlichen Subgruppen einer Population ein

unterschiedlich großes Gewicht. Hat Risikofaktor A in einer Subpopulation einen sehr großen Einfluss auf die Entstehung einer Krankheit, können in einer anderen Situation oder Untergruppe derselben Gesamtpopulation andere Faktoren dominieren, so dass sich die Bedeutung desselben Faktors A erheblich vermindert. Umgekehrt kann ein nur in einem Teil der Population mit der Krankheitsentstehung assoziierter Faktor bei einer hohen Signifikanz in der Untergruppe zur falsch positiven Assoziationsannahme bei der Betrachtung der Gesamtpopulation führen. Durch die Überlagerung verschiedener Faktoren in der Gesamtpopulation können Einflüsse einzelner Faktoren also zu gering oder zu stark erscheinen. Schlüsselt man die untersuchten Populationen in Untergruppen auf, so wird die Sensitivität und Spezifität von Assoziationsstudien erhöht. Die Subgruppenbildung nach Bedingungen, die für die Individuen der jeweiligen Untergruppe gemeinsam gelten, wird Konditionierung genannt. Limitierend wirkt hierbei der Stichprobenumfang, der bei Konditionierung leicht zu klein wird, um statistisch aussagekräftig zu bleiben.

2.5 Mathematische Methoden zur statistischen Auswertung

2.5.1 Genfrequenz

Bei diploiden Individuen können drei verschiedene Genotypen auftreten: Das Allelpaar A und a tritt entweder als AA, Aa (2x) oder aa auf. Zählt man die einzelnen Genotypen, kann die Häufigkeit der einzelnen Allele ermittelt werden.

Tabelle 6: Exemplarische Darstellung der Genfrequenzberechnung

	Genotyp			Total	Frequenz des Gens
	AA	Aa	aa		
Anzahl der Individuen	80	18	2	100	$178/200 = 89\%$ $22/200 = 11\%$
Anzahl des Gens A	160	18	0	178	
Anzahl des Gens a	0	18	4	22	
Gengesamtanzahl	160	36	4	200	

2.5.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Godfrey Harold Hardy und Wilhelm Weinberg entwickelten zu Beginn des 20. Jahrhunderts unabhängig voneinander ein Prinzip in der Populationsgenetik, das es erlaubte, die Häufigkeit eines Allels in einer idealen Population zu berechnen. Unter „idealer Population“ wird eine Population verstanden, die folgende Kriterien erfüllt: Eine sehr große Anzahl von Individuen, Panmixie, (jedes Individuum einer Population paart sich mit gleicher Wahrscheinlichkeit mit jedem anderen des anderen Geschlechts), ein konstant bleibender Selektionsdruck, gleich bleibende Allelfrequenzen, kein Gendrift, keine Mutation. Diese Bedingungen sind zwar in der Realität nie erfüllt, jedoch lässt sich das Modell insbesondere für große Populationen anwenden.

Das Prinzip des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts wird in den folgenden Formeln ausgedrückt. Sie beschreiben den Gleichgewichtszustand einer idealen Population, p und q sind konstant.

$$[1] p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

$$[2] p + q = 1 \quad \text{wobei: } p: \text{Frequenz des Allels A und } q: \text{Frequenz (des zu A komplementären) Allels a}$$

Im Kombinationsquadrat nach Punnett bedeutet dies:

Tabelle 7: Kombinationsquadrat für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

		weiblich	
		A (p)	a (q)
männlich	A (p)	AA (p ²)	Aa (pq)
	a (q)	Aa (pq)	aa (q ²)

Die Erfüllung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes dient bei genetischen Untersuchungen als Qualitätsmerkmal. Zur Überprüfung der gefundenen Genotypen-Frequenzen einer untersuchten Population wird diese mit der nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erwarteten Frequenz (Hardy-Weinberg-Frequenz) verglichen. Dazu wird der weiter unten beschriebene χ^2 -Test angewandt. Ist der p-Wert $> 0,05$, so befindet sich die untersuchte Population für dieses Merkmal im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

1. Ermittlung der Hardy-Weinberg-Frequenz:

Tabelle 8: Exemplarische Darstellung der Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes

Genotyp	Erwartete Genotypfrequenz	Erwartet %	Beobachtet %
AA	$p^2 = (0,89)^2 = 0,79$	79	80
Aa	$2pq = 2 \cdot (0,89) \cdot (0,11) = 0,19$	19	18
aa	$q^2 = (0,11)^2 = 0,01$	1	2

2. Vergleich der erwarteten und der beobachteten Genfrequenzen im χ^2 -Test:

Im χ^2 -Test ergibt sich ein p-Wert von 0,83. Die untersuchte Population befindet sich somit im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

2.5.3 χ^2 -Vierfeldertest

Zum Vergleich zweier Gruppen hinsichtlich eines Merkmals dient der χ^2 -Vierfeldertest. Er vergleicht die beobachteten Häufigkeiten einer Verteilung (n_{ij}) mit den erwarteten Häufigkeiten der Verteilung (φ_{ij}).

$$\chi^2 = \sum_{ij} \frac{(n_{ij} - \varphi_{ij})^2}{\varphi_{ij}}$$

Ist die Differenz zwischen erwarteter und beobachteter Häufigkeit eines Merkmals groß, so ist es wahrscheinlich, dass sich die Gruppen hinsichtlich der Verteilung des Merkmals unterscheiden. χ^2 ist hierbei die Summe der standardisierten Abweichungen aller Felder. In den meisten Fällen ist die untersuchte Population im Vergleich zur Gesamtpopulation nur sehr klein. Um die Stetigkeit der Werte bei kleinen Stichprobenzahlen zu gewährleisten, ist eine Korrektur der Ergebnisse des χ^2 -Vierfeldertests nach Yates erforderlich. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Korrektur durchgeführt. Eine Wahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ wurde als signifikant akzeptiert.

2.5.4 Transmission-Disequilibrium-Test (TDT)

Die Transmissionshäufigkeit von Allelen innerhalb einer Familie kann mit Hilfe des TDT untersucht werden. Dabei wird die Häufigkeit von an die Tochtergeneration weitergegebenen Allelen mit der der nicht weitergegebenen Allelen verglichen. Krankheitsassoziationen eines Polymorphismus können so sensitiver und spezifischer erkannt werden als mit dem χ^2 -Vierfeldertest, der mit der Integrität der Kontrollgruppe steht und fällt. Beim TDT sind es die nicht transmittierten Allele, die als interne Kontrollen fungieren. Es können im TDT nur für den untersuchten Polymorphismus heterozygote Eltern berücksichtigt werden, denn nur dann ist eine eindeutige Unterscheidung zwischen der Transmission des einen oder des anderen Allels möglich. Heterozygote Individuen vererben ein bestimmtes Allel mit einer Wahrscheinlichkeit von 50%. Der TDT misst die Wahrscheinlichkeit einer Abweichung der beobachteten Verteilung von der anhand des χ^2 -Tests zu erwartenden Verteilung.

Die untenstehende Formel drückt diese Zusammenhänge aus, die Operatoren ergeben sich aus Tabelle 9:

Tabelle 9: Exemplarische Darstellung des TDT

	Nicht-transmittiertes Allel		
	M1	M2	Summe
Transmittiertes Allel			
M1	a	b	a + b
M2	c	d	c + d
Summe	a + c	b + d	2n

$$\chi^2 = \frac{[b - (b+c)/2]^2}{(b+c)/2} + \frac{[c - (b+c)/2]^2}{(b+c)/2} = \frac{(b-c)^2}{b+c}$$

Auch hier wird eine Wahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ als signifikant akzeptiert.

2.5.5 Odds Ratio (OR)

Die Odds Ratio bezeichnet das Verhältnis (Ratio) der Chance (Odds), dass ein Ereignis oder Endpunkt in der experimentellen Gruppe eintritt, zu der Chance (Odds), dass das Ereignis in der Kontrollgruppe eintritt. Ist eine Gruppe mit einem Risikofaktor belastet, die Vergleichsgruppe aber nicht, dann ist die OR ein Maß für die Stärke des Risikofaktors. Die OR kann Zahlenwerte zwischen 0 und ∞ annehmen, wobei eine OR von 1 bedeutet, dass zwischen den Vergleichsgruppen kein Unterschied besteht. Ist die OR hoch, so ist der Risikofaktor ein schwerwiegender.

Es folgt ein Beispiel zur Berechnung der OR.

Tabelle 10: Exemplarische Darstellung der Berechnung der OR

	Anzahl der Personen mit Risikofaktor	Anzahl der Personen ohne Risikofaktor
Anzahl der erkrankten Personen	a = 120	b = 30
Anzahl der nicht erkrankten Personen	c = 2040	d = 7980

Es gilt dann: $OR = \frac{a/c}{b/d} = \frac{a \times d}{b \times c}$

für obiges Beispiel also: $OR = \frac{120 \times 7980}{30 \times 2040} = 15,65$

Unter den Personen, die den Risikofaktor tragen, ist damit die Chance zu erkranken etwa 16x höher als unter den Personen, die ihn nicht tragen.

3 Ergebnisse

3.1 Überblick über die durchgeführten Untersuchungen

Es wurden 106 Patienten mit Hashimoto-Thyreoditis, 258 Patienten mit Morbus Basedow und 195 Patienten mit Morbus Addison jeweils gesunden Kontrollen gegenübergestellt. Als Kontrollgruppe dienten 227 gesunde Individuen ohne Familienanamnese für eine endokrine Autoimmunopathie. Patienten und Kontrollen kamen alle aus Deutschland.

Für die Berechnung der Genotypen- und Allelverteilungen wurde der χ^2 -Test verwendet und ein p-Wert $< 0,05$ als signifikant angenommen.

Neben der Betrachtung „Patienten gegenüber Kontrollen“ in der Gesamtheit wurden verschiedene Subgruppen gebildet, die im entsprechenden Abschnitt genauer charakterisiert werden.

Darüber hinaus wurde die Transmission der Allele des rs1990760-Polymorphismus in 134 italienischen Familien mit einem von Hashimoto-Thyreoditis betroffenen Kind untersucht. Im Weiteren werden diese Familien als „Hashimoto-Familien“ bezeichnet. Zur Transmissionsanalyse bei Morbus Basedow standen 57 deutsche Familien mit betroffenem Kind zur Verfügung, die hier als „Basedow-Familien“ bezeichnet werden. Die Transmissionshäufigkeiten wurden mit Hilfe des TDT ermittelt.

Auch bei den Familienanalysen wurde die Gesamtgruppe der betroffenen Familien in Subgruppen unterteilt, die verschiedene krankheitsassoziierte Risiken aufweisen. Sie werden in den entsprechenden Abschnitten genauer charakterisiert.

3.2 Hashimoto-Thyreoditis

3.2.1 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Hashimoto-Patienten und gesunden Kontrollen

Die Genotypenanalyse bei 106 Patienten mit Hashimoto-Thyreoditis und 227 gesunden Kontrollen zeigte keine Unterschiede.

Tabelle 11: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Patienten mit Hashimoto-Thyreoditis gegenüber Kontrollen

Genotyp	Patienten (n = 106)		Kontrollen (n = 227)		p-Wert (χ^2)
	n	Frequenz	n	Frequenz	
AA	41	38,7%	87	38,3%	0,24
AG	45	42,4%	112	49,3%	
GG	20	18,9%	28	12,3%	

Auch in der Allelverteilung war kein Unterschied zwischen den Patienten und den gesunden Kontrollpersonen zu erkennen.

Tabelle 12: Allelfrequenzanalyse des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Patienten mit Hashimoto-Thyreoditis und Kontrollen

Allel	Patienten		Kontrollen		p-Wert (χ^2)	OR [95%CI]
	n	Frequenz	n	Frequenz		
A	127	40,1%	286	63,0%	0,49	0,88 [0,63-1,23]
G	85	59,9%	168	37,0%		1,14 [0,82-1,59]

3.2.2 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Hashimoto-Thyreoditis im Zusammenhang mit dem HLA-Risiko

Träger bestimmter DQ-Allele haben ein erhöhtes Risiko, an Hashimoto-Thyreoditis zu erkranken. Verschiedene Genloci mit ihren Polymorphismen zeigen unterschiedlich starke Einflüsse auf das Erkrankungsrisiko. Hat ein Patient ein hohes HLA-bedingtes Risiko, treten Einflüsse anderer Polymorphismen möglicherweise in den Hintergrund. Bei Patientengruppen mit niedrigem HLA-bedingtem Risiko ist der Einfluss anderer genetischer Faktoren am stärksten nachweisbar. Daher wurde eine Subgruppenanalyse durchgeführt, die die Genotypenverteilung des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 im Zusammenhang mit dem HLA-Risikoallel DQ2 (DQ2=DQA1*0501-DQB1*0201) betrachtet.

Träger des HLA-Allels DQ2 wurden in der Gruppe „DQ2⁺“ zusammengefasst, Individuen ohne das Allel sind der Gruppe „DQ2⁻“ zugeordnet.

In den Subgruppen waren keine Unterschiede in der Genotypenverteilung zu beobachten.

Tabelle 13: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen bei Patienten mit Hashimoto-Thyreoditis gegenüber Kontrollen

HLA	Genotyp	Patienten		Kontrollen		p-Wert (X ²)
		n	Frequenz	n	Frequenz	
DQ2 ⁺		Patienten (n = 12)		Kontrollen (n = 31)		0,89
	AA	5	41,7%	11	35,5%	
	AG	5	41,7%	13	41,9%	
	GG	2	16,6%	7	22,6%	
DQ2 ⁻		Patienten (n = 18)		Kontrollen (n = 57)		0,81
	AA	8	44,4%	24	42,1%	
	AG	8	44,4%	29	50,9%	
	GG	2	11,2%	4	7,0%	

Auch in der Allelverteilung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei an Hashimoto-Thyreoditis erkrankten Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen mit den jeweiligen HLA-Allelen.

Tabelle 14: Allelfrequenzanalyse des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 im Zusammenhang mit HLA-Allelen bei Patienten gegenüber Kontrollen

HLA	Allel	Patienten		Kontrollen		p-Wert (χ^2)	Odds-Ratio [95% CI]
		n	Frequenz	n	Frequenz		
DQ2 ⁺		Patienten (n = 12)		Kontrollen (n = 31)		0,79	
	A	15	62,5%	35	56,5%		0,78 [0,3-2,05]
	G	9	37,5%	27	43,5%		1,29 [0,49-3,38]
DQ2 ⁻		Patienten (n = 18)		Kontrollen (n = 57)		0,92	
	A	24	66,7%	77	67,5%		1,04 [0,47-2,31]
	G	12	33,3%	37	32,5%		0,96 [0,43-2,13]

3.2.3 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei männlichen und weiblichen Individuen

Das weibliche Geschlecht ist ein wesentlicher Risikofaktor für die Erkrankung an Hashimoto-Thyreoditis. Daher wurde eine geschlechtsspezifische Betrachtung der Genotyp- und Allelverteilungen bei An- und Abwesenheit des HLA-Risikoallels DQ2 (DQA*0501-DQB*0201) durchgeführt.

Es ergaben sich bei der Betrachtung der Genotypen keine signifikanten Unterschiede zwischen betroffenen Individuen und gesunden Kontrollen, weder in der Gruppe mit HLA-bedingtem Risiko (Träger des Risikoallels DQ2, hier als „DQ2⁺“ bezeichnet) noch bei Patienten ohne HLA-bedingtes Erkrankungsrisiko („DQ2⁻“).

Ergebnisse

Durch die Bildung von Subgruppen wurden die Fallzahlen teilweise sehr gering und spiegeln möglicherweise nicht die Verhältnisse in größeren Studienpopulationen wider.

Tabelle 15: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen und dem Geschlecht bei Patienten mit Hashimoto-Thyreoditis gegenüber Kontrollen

Risiko-HLA/ Geschlecht	Genotyp	Patienten		Kontrollen		p-Wert (χ^2)
		n	Frequenz	n	Frequenz	
		Patienten (n = 8)		Kontrollen (n = 18)		0,95
DQ2+/ weiblich	AA	3	37,5%	7	38,9%	
	AG	4	50,0%	8	44,4%	
	GG	1	12,5%	3	16,7%	
		Patienten (n = 2)		Kontrollen (n = 13)		0,65
DQ2+/ männlich	AA	1	50,0%	4	30,8%	
	AG	1	50,0%	5	38,5%	
	GG	0	0,0%	4	30,7%	
		Patienten (n = 11)		Kontrollen (n = 31)		0,73
DQ2-/ weiblich	AA	5	45,5%	15	48,4%	
	AG	5	45,5%	15	48,4%	
	GG	1	9,0%	1	3,2%	
		Patienten (n = 1)		Kontrollen (n = 26)		0,41
DQ2-/ männlich	AA	1	100,0%	9	34,6%	
	AG	0	0,0%	14	53,9%	
	GG	0	0,0%	3	11,5%	

Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Allelverteilung ließen sich ebenfalls nicht beobachten, unabhängig von der An-oder Abwesenheit des Risikoallels DQ2.

Ergebnisse

Tabelle 16: Allelfrequenzanalyse des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen und dem Geschlecht bei Patienten mit Hashimoto-Thyreoditis gegenüber Kontrollen

HLA/Geschlecht	Allel	n	Frequenz	n	Frequenz	p-Wert (χ^2)	OR [95% CI]
DQ2+/ weiblich		Patienten (n = 8)		Kontrollen (n = 18)		0,83	
	A	10	62,5%	22	61,1%		0,94 [0,28-3,17]
	G	6	37,5%	14	38,9%		1,06 [0,32-3,57]
DQ2+/ männlich		Patienten (n = 2)		Kontrollen (n = 13)		0,69	
	A	3	75,0%	13	50,0%		0,33 [0,03-3,64]
	G	1	25,0%	13	50,0%		3 [0,27-32,75]
DQ2-/ weiblich		Patienten (n = 11)		Kontrollen (n = 31)		0,91	
	A	15	68,2%	45	72,6%		1,24 [0,43-3,55]
	G	7	31,8%	17	27,4%		0,81 [0,28-2,33]
DQ2-/ männlich		Patienten (n = 1)		Kontrollen (n = 26)		0,72	
	A	2	100,0%	32	61,5%		*
	G	0	0,0%	20	38,5%		*

*OR wegen geringer Fallzahl nicht errechenbar

3.2.4 IFIH1-Polymorphismus rs1990760, Hashimoto-Thyreoditis und Antikörperstatus (TPO-Ak und Tg-Ak)

Bei Patienten mit Hashimoto-Thyreoditis spielen die Antikörper gegen Thyreoglobulin (Tg-Ak) und gegen die Thyreoperoxidase (TPO-Ak) eine Rolle. Der Antikörperstatus von 41 Patienten war bekannt und wurde mit Antikörpernegativen Kontrollen verglichen.

In der Antikörper-positiven Subgruppe zeigten sich bei der Betrachtung der Genotypenverteilung des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 keine Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

Ergebnisse

Tabelle 17: Genotypenverteilung bei Antikörper-positiven Hashimoto-Patienten gegenüber Kontrollen

Genotyp	Patienten (n = 41)		Kontrollen (n = 227)		p-Wert (χ ²)
	n	Frequenz	n	Frequenz	
AA	15	36,6%	87	38,3%	0,25
AG	17	41,5%	112	49,4%	
GG	9	21,9%	28	12,3%	

Die Allelverteilung bei Antikörper-positiven Patienten wick nicht signifikant von der bei gesunden Kontrollen ab.

Tabelle 18: Allelverteilung bei Antikörper-positiven Hashimoto-Patienten gegenüber Kontrollen

Allel	Patienten		Kontrollen		p-Wert (χ ²)	Odds Ratio [95%CI]
	n	Frequenz	n	Frequenz		
A	47	57,3%	286	63,0%	0,39	1,27 [0,79-2,04]
G	35	42,7%	168	37,0%		0,79 [0,49-1,27]

3.3 Hashimoto-Familienanalysen

Der Polymorphismus rs1990760 wurde in 149 italienischen Familien mit einem an Hashimoto-Thyreoditis erkrankten Kind untersucht. Neben der getrennten Betrachtung mütterlicher und väterlicher Vererbung wurden Subgruppen gebildet, die den TPO-Antikörperstatus der Eltern berücksichtigen. Weitere Untergruppen nach HLA-Typen der Eltern setzen die Transmission der Genotypen und Allele in einen Zusammenhang mit dem HLA-bedingten Risiko des erkrankten Kindes.

Die Berechnung der Signifikanz der unterschiedlichen Transmission (T) und Nicht-Transmission (NT) erfolgte anhand des TDT.

Die Analyse des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 mit den Allelen „A“ und „G“ ergab hinsichtlich der Transmission und Nicht-Transmission keinen Unterschied. Das Allel „A“ wurde zu 49,8% transmittiert, das Allel „G“ zu 50,2%. Nicht transmittiert wurde das Allel „A“ zu 50,2%, das Allel „G“ zu 49,8%. Die Allelfrequenzen betragen 53,5% für das Allel „A“ und 46,5% für das Allel „G“.

Tabelle 19: Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Hashimoto-Familien

		Eltern (n = 298)				p-Wert (χ^2)
		T		NT		
Allel	Frequenz	n	Frequenz	n	Frequenz	
A	53,5%	159	49,8%	160	50,2%	0,93
G	46,5%	139	50,2%	138	49,8%	

Ergebnisse

Die selektive Betrachtung mütterlicher beziehungsweise väterlicher Vererbung des untersuchten Polymorphismus zeigte keine Unterschiede in der Transmission und Nicht-Transmission der Allele „A“ und „G“.

Bei der mütterlichen Vererbung betragen die Allelfrequenzen 55,8% für das Allel „A“ und 44,2% für das Allel „G“. Von Müttern wurde das Allel „A“ zu 50,4% transmittiert, das Allel „G“ zu 49,5%. Nicht transmittiert wurde das Allel „A“ zu 49,6%, das Allel „G“ zu 50,5%.

Tabelle 20: Mütterliche Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Hashimoto-Familien.

		Mütter (n = 121)				p-Wert (χ^2)
		T		NT		
Allel	Frequenz	n	Frequenz	n	Frequenz	0,90
A	55,8%	68	50,4%	67	49,6%	
G	44,2%	53	49,5%	54	50,5%	

Die väterlichen Allelfrequenzen betragen 52,9% für das Allel „A“ und 47,1% für das Allel „G“. Von den Vätern wurde das Allel „A“ zu 49,2% transmittiert, das Allel „G“ zu 50,9%. Nicht transmittiert wurde das Allel „A“ zu 50,8%, das Allel „G“ zu 49,1%.

Tabelle 21: Väterliche Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Hashimoto-Familien

		Väter (n = 121)				p-Wert (χ^2)
		T		NT		
Allel	Frequenz	n	Frequenz	n	Frequenz	0,80
A	52,9%	63	49,2%	65	50,8%	
G	47,1%	58	50,9%	56	49,1%	

3.3.1 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 und HLA-Risiko der Eltern

Die verschiedenen HLA-Haplotypen wurden auch in die Familienanalysen einbezogen. Eltern mit dem HLA-DQ2-Allel wurden der Risikogruppe („DQ2⁺“) zugeordnet, Eltern ohne das Allel DQ2 der Gruppe ohne HLA-bedingtes Risiko („DQ2⁻“).

Die Transmission der Allele „A“ und „G“ von Eltern auf betroffene Kinder zeigte in keiner der nach HLA-Risiko eingeteilten Gruppen signifikante Unterschiede. In der Gruppe, in der die Eltern Träger des Allels DQ2 waren, ließ sich eine Tendenz des selteneren Allels „G“ beobachten, weniger häufig transmittiert zu werden (55,1% Nicht-Transmission zu 44,9% Transmission, $p = 0,09$)

Tabelle 22: Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Hashimoto-Familien in Zusammenhang mit HLA-Allelen

Eltern (n = 248)	Allel	Frequenz	T		NT		p-Wert (χ^2)
			n	Frequenz	n	Frequenz	
DQ2 ⁺ (n = 72)	A	52,1%	82	54,7%	68	45,3%	0,09
	G	47,9%	62	44,9%	76	55,1%	
DQ2 ⁻ (n = 52)	A	53,8%	56	50,0%	56	50,0%	1,00
	G	46,2%	48	50,0%	48	50,0%	

Die separate Betrachtung der mütterlichen Vererbung erbrachte ebenfalls keine Unterschiede in der Transmission oder Nicht-Transmission eines der Allele. Es zeigte sich jedoch bei den Müttern, die Trägerinnen des Allels HLA-DQ2 sind, eine Tendenz des selteneren Allels „G“, nicht transmittiert zu werden (59,6% Nicht-Transmission zu 40,4% Transmission, $p = 0,06$).

Ergebnisse

Tabelle 23: Mütterliche Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Hashimoto-Familien in Zusammenhang mit HLA-Allelen

Mütter (n = 100)	Allel	Frequenz	T		NT		p-Wert (χ^2)
			n	Frequenz	n	Frequenz	
DQ2 ⁺ (n = 58)	A	55,2%	37	57,8%	27	42,2%	0,06
	G	44,8%	21	40,4%	31	59,6%	
DQ2 ⁻ (n = 42)	A	54,8%	21	45,7%	25	54,3%	0,38
	G	45,2%	21	55,3%	17	44,7%	

Bei der Transmission von Vätern auf betroffene Kinder konnte keine Tendenz zu einer häufigeren Transmission eines der Allele beobachtet werden, weder in der DQ2⁺ noch in der DQ2⁻ Gruppe.

Tabelle 24: Väterliche Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Hashimoto-Familien in Zusammenhang mit HLA-Allelen

Väter (n = 100)	Allel	Frequenz	T		NT		p-Wert (χ^2)
			n	Frequenz	n	Frequenz	
DQ2 ⁺ (n = 58)	A	50,0%	31	53,4%	27	46,6%	0,46
	G	50,0%	27	46,6%	31	53,4%	
DQ2 ⁻ (n = 42)	A	54,8%	25	54,3%	21	45,7%	0,38
	G	45,2%	17	44,7%	21	55,3%	

3.3.2 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Hashimoto-Familien und elterlicher Antikörperstatus (TPO-Ak und Tg-Ak)

Tg- und TPO-Antikörper werden immer wieder bei Menschen nachgewiesen, die keine Symptome einer Hashimoto-Thyreoditis oder einer anderen Schilddrüsenerkrankung zeigen. In den 100 hier untersuchten italienischen Familien, in denen jeweils das Kind an Hashimoto-Thyreoditis erkrankt war, wurde der elterliche Antikörperstatus (TPO-Ak und TG-Ak) in die Untersuchung einbezogen. Als Ak-positiv wurden Eltern eingestuft, deren Ak-Titer das doppelte des oberen Normalwertes betrug (TPO-Ak > 40 IU/ml bei einem Normalwert von 20 IU/ml und Tg-Ak > 100 IU/ml bei einem Normalwert von 50 IU/ml).

Die folgenden Subgruppen wurden gebildet:

Gruppe 1: Weder bei Mutter noch Vater waren Schilddrüsenantikörper präsent (M-, V-)

Gruppe 2: Nur bei der Mutter waren Schilddrüsenantikörper präsent (M+, V-)

Gruppe 3: Nur beim Vater waren Schilddrüsenantikörper präsent (M-, V+)

Gruppe 4: Bei Mutter und Vater waren Schilddrüsenantikörper präsent (M+, V+)

In den Gruppen 1-3 zeigten sich keine Unterschiede in der Transmission bzw. Nicht-Transmission.

In Gruppe 4, in der Mutter und Vater positiv für Schilddrüsenantikörper waren, zeigte sich eine häufigere Transmission des Allels „A“ auf das von Hashimoto-Thyreoditis betroffene Kind (61,8% Transmission zu 38,3% Nicht-Transmission, $p = 0,05$), wohingegen das Allel „G“ häufiger nicht transmittiert als transmittiert wurde (38,2% Transmission zu 61,8% Nicht-Transmission, $p = 0,05$). In dieser Gruppe zeigte sich eine 50:50-Verteilung bei den Allelfrequenzen, bei allen anderen Gruppen war durchweg das Allel „G“ seltener vorhanden als das Allel „A“.

Ergebnisse

Tabelle 25: Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Hashimoto-Familien in Zusammenhang mit dem Antikörperstatus der Eltern

	Allel	Frequenz	T		NT		p-Wert (χ^2)	OR [95% CI]
			n	Frequenz	n	Frequenz		
Eltern gesamt n = 100	A	55,5%	110	49,5%	112	50,5%	0,84	0,96 [0,65-1,43]
	G	44,5%	90	50,6%	88	49,4%		1,04 [0,70-1,55]
Gruppe 1 n = 39 M-,V-	A	53,2%	38	45,8%	45	54,2%	0,26	0,70 [0,37-1,31]
	G	46,8%	40	54,8%	33	45,2%		1,44 [0,76-2,70]
Gruppe 2 n = 35 M+,V-	A	57,9%	41	50,6%	40	49,4%	0,86	1,06 [0,54-2,08]
	G	42,1%	29	49,2%	30	50,8%		0,94 [0,48-1,85]
Gruppe 3 n = 9 M-,V+	A	66,7%	10	41,7%	14	59,3%	0,15	0,36 [0,08-1,52]
	G	33,3%	8	66,7%	4	33,3%		2,80 [0,66-11,90]
Gruppe 4 n = 17 M+,V+	A	50,0%	21	61,8%	13	38,3%	0,05	2,61 [0,98-6,94]
	G	50,0%	13	38,2%	21	61,8%		0,38 [0,14-1,02]

3.4 Morbus Basedow

3.4.1 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Morbus Basedow-Patienten und gesunden Kontrollen

Es wurden 258 deutsche Patienten mit Morbus Basedow und 227 gesunde deutsche Kontrollen auf den IFIH1-rs1990760-Polymorphismus hin untersucht und gegenübergestellt. In der Distribution der Genotypen fanden sich keine Unterschiede.

Tabelle 26: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Patienten mit Morbus Basedow gegenüber Kontrollen

Genotyp	Patienten (n = 258)		Kontrollen (n = 227)		p-Wert (χ^2)
	n	Frequenz	n	Frequenz	
AA	88	34,1%	87	38,4%	0,55
AG	132	51,2%	112	49,3%	
GG	38	14,7%	28	12,3%	

Die Allelverteilung erwies sich ebenfalls als nicht unterschiedlich, Patienten und Kontrollen zeigten ähnliche Allelhäufigkeiten.

Tabelle 27: Allelfrequenzanalyse des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Patienten mit Morbus Basedow gegenüber Kontrollen

Allel	Patienten		Kontrollen		p-Wert (χ^2)	Odds Ratio [95%CI]
	n	Frequenz	n	Frequenz		
A	308	59,7%	286	63,0%	0,32	0,87 [0,67-1,13]
G	208	40,3%	168	37,0%		1,15 [0,89-1,49]

3.4.2 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Morbus Basedow im Zusammenhang mit dem HLA-Risiko

Das HLA-Allel DQ2 (DQ2=DQA1*0501-DQB1*0201) spielt auch bei Morbus Basedow eine Rolle, Träger dieses Allels zeigen eine erhöhte Anfälligkeit für Morbus Basedow. Daher wurden die Genotypen- und Allelverteilungen des IFIH1-rs1990760 Polymorphismus im Zusammenhang mit den HLA-Typen der Patienten und Kontrollen untersucht. Träger des HLA-DQ2-Allels wurden der Risikogruppe (DQ2⁺) zugeordnet, Individuen ohne dieses Allel der Gruppe ohne HLA-bedingtes Risiko (DQ2⁻).

In der Genotypenverteilung ergaben sich bei keiner der nach HLA-Typ aufgeteilten Subgruppen Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

Tabelle 28: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen bei Patienten mit Morbus Basedow gegenüber Kontrollen

HLA	Genotyp	Patienten		Kontrollen		p-Wert (χ^2)
		n	Frequenz	n	Frequenz	
DQ2 ⁺		Patienten (n = 86)		Kontrollen (n = 31)		0,27
	AA	29	33,7%	11	35,5%	
	AG	47	54,7%	13	41,9%	
	GG	10	11,6%	7	22,6%	
DQ2 ⁻		Patienten (n = 90)		Kontrollen (n = 57)		0,23
	AA	28	31,1%	24	42,1%	
	AG	49	54,4%	29	50,9%	
	GG	13	14,5%	4	7,0%	

Auch die Allelverteilungen des IFIH1-rs1990760 Polymorphismus waren in den nach HLA-Typ gebildeten Subgruppen ähnlich.

Tabelle 29: Allelfrequenzanalyse des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen bei Patienten mit Morbus Basedow gegenüber Kontrollen

HLA	Allel	Patienten		Kontrollen		p-Wert (χ^2)	OR [95% CI]
		n	Frequenz	n	Frequenz		
DQ2 ⁺		Patienten (n = 86)		Kontrollen (n = 31)		0,63	
	A	105	61,0%	35	56,5%		1,21 [0,67-2,18]
	G	67	39,0%	27	43,5%		0,83 [0,46-1,49]
DQ2 ⁻		Patienten (n = 90)		Kontrollen (n = 57)		0,14	
	A	105	58,3%	77	67,5%		0,67 [0,41-1,1]
	G	75	41,7%	37	32,5%		1,49 [0,91-2,43]

3.4.3 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei männlichen und weiblichen Individuen

Wie für die Erkrankung an Hashimoto-Thyreoditis, so ist auch bei Morbus Basedow ein deutlich erhöhtes Risiko für die Erkrankung mit dem weiblichen Geschlecht assoziiert.

Es wurden daher Subgruppen gebildet, die neben den HLA-Typen auch das Geschlecht der untersuchten Patienten und Kontrollen berücksichtigen.

Bei der Genotypenverteilung war kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der drei Genotypen zu erkennen. In der Gruppe der DQ2⁻ Patientinnen fand sich ein Trend zugunsten des Allels „G“ (AG + GG = 66,6% bei Patientinnen gegenüber AG + GG = 51,6% bei weiblichen Kontrollen, p = 0,09).

Ergebnisse

Tabelle 30: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen und dem Geschlecht bei Patienten mit Morbus Basedow gegenüber Kontrollen

HLA/ Geschlecht	Genotyp	Patienten		Kontrollen		p-Wert (χ^2)
		n	Frequenz	n	Frequenz	
DQ2+/ weiblich		Patienten (n = 48)		Kontrollen (n = 18)		0,57
	AA	15	31,3%	7	38,9%	
	AG	28	58,3%	8	44,4%	
	GG	5	10,4%	3	16,7%	
DQ2+/ männlich		Patienten (n = 14)		Kontrollen (n = 13)		0,58
	AA	5	35,7%	4	30,8%	
	AG	7	50,0%	5	38,4%	
	GG	2	14,3%	4	30,8%	
DQ2-/ weiblich		Patienten (n = 54)		Kontrollen (n = 31)		0,09
	AA	18	33,3%	15	48,4%	
	AG	26	48,2%	15	48,4%	
	GG	10	18,5%	1	3,2%	
DQ2-/ männlich		Patienten (n = 11)		Kontrollen (n = 26)		0,53
	AA	6	54,5%	9	34,6%	
	AG	4	36,4%	14	53,9%	
	GG	1	9,1%	3	11,5%	

Weder das Allel „A“ noch das Allel „G“ war in einer der Gruppen in statistisch relevantem Maße häufiger. Es zeigte sich jedoch auch bei den Allelverteilungen eine Tendenz, dass das Allel „G“ bei Patientinnen ohne HLA-Risikoallel DQ2 häufiger zu finden war als bei gesunden Kontrollen derselben HLA-Risikogruppe (42,6% vs. 27,4%, $p = 0,07$).

Ergebnisse

Tabelle 31: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen und Geschlecht bei Patienten mit Morbus Basedow gegenüber Kontrollen

HLA/ Ge- schlecht	Allel	n	Frequenz	n	Frequenz	p-Wert (χ^2)	OR [95% CI]
DQ2+/ weiblich		Patienten (n = 48)		Kontrollen (n = 18)		0,90	
	A	58	60,4%	22	61,1%		0,97 [0,44-2,13]
	G	38	39,6%	14	38,9%		1,03 [0,47-2,26]
DQ2+/ männlich		Patienten (n = 14)		Kontrollen (n = 13)		0,61	
	A	17	60,7%	13	50,0%		1,55 [0,52-4,55]
	G	11	39,3%	13	50,0%		0,65 [0,22-1,91]
DQ2-/ weiblich		Patienten (n = 54)		Kontrollen (n = 31)		0,07	
	A	62	57,4%	45	72,6%		0,51 [0,26-1,00]
	G	46	42,6%	17	27,4%		1,96 [1,0-3,86]
DQ2-/ männlich		Patienten (n = 11)		Kontrollen (n = 26)		0,51	
	A	16	72,7%	32	61,5%		1,67 [0,56-4,97]
	G	6	27,3%	20	38,5%		0,60 [0,20-1,79]

3.4.4 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Morbus Basedow und TSH-Rezeptor-Antikörper

Der TSH-Rezeptor-Antikörper ist bei Morbus Basedow mitverantwortlich für die Entstehung der Hyperthyreose, jedoch nicht immer nachweisbar. Ein positiver TSH-Rezeptor-Antikörperbefund lag bei 46 von insgesamt 258 Patienten vor (17,8%). Diese wurden mit Antikörper-negativen Kontrollen verglichen.

Es zeigte sich kein Unterschied in der Genotypenverteilung.

Ergebnisse

Tabelle 32: Genotypenverteilung bei Antikörper-positiven Morbus Basedow-Patienten gegenüber Kontrollen

Genotyp	Patienten (n = 46)		Kontrollen (n = 227)		p-Wert (χ^2)
	n	Frequenz	n	Frequenz	
AA	14	30,4%	87	38,4%	0,35
AG	23	50,0%	112	49,3%	
GG	9	19,6%	28	12,3%	

Auch die Allelverteilung bei Patienten wich nicht signifikant von der bei Kontrollen ab.

Tabelle 33: Allelverteilung bei Antikörper-positiven Morbus-Basedow-Patienten gegenüber Kontrollen

Allel	Patienten		Kontrollen		p-Wert (χ^2)	OR [95% CI]
	n	Frequenz	n	Frequenz		
A	51	55,4%	286	63,0%	0,21	0,73 [0,46-1,15]
G	41	44,6%	168	37,0%		1,37 [0,87-2,15]

3.5 Basedow-Familienanalysen

Bei der Untersuchung von 59 deutschen Familien mit einem von Morbus Basedow betroffenen Kind ergab die Analyse des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 mit den Allelen „A“ und „G“ hinsichtlich der Transmission und Nicht-Transmission keinen Unterschied. Das Allel „A“ wurde zu 46,5% transmittiert, das Allel „G“ zu 57,1%. Nicht transmittiert wurde das Allel „A“ zu 53,5%, das Allel „G“ zu 42,9%. Die Allelfrequenzen betragen 67,4% für das Allel „A“ und 32,6% für das Allel „G“.

Tabelle 34: Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Basedow-Familien

		Eltern (n = 118)					
		T		NT			
Allel	Frequenz	n	Frequenz	n	Frequenz	p-Wert (χ ²)	OR [95% CI]
A	67,4%	74	46,5%	85	53,5%	0,13	0,65 [0,38-1,13]
G	32,6%	44	57,1%	33	42,9%		1,53 [0,89-2,65]

Bei der Betrachtung der geschlechtsspezifischen Vererbung von Müttern auf betroffene Kinder und von Vätern auf betroffene Kinder zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede, jedoch ergab sich eine Tendenz des selteneren Allels „G“ zur Transmission von Müttern auf betroffene Kinder (61,8%, **p = 0,09**).

Ergebnisse

Tabelle 35: Mütterliche Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Basedow-Familien

		Mütter (n = 53)					
		T		NT			
Allel	Frequenz	n	Frequenz	n	Frequenz	p-Wert (χ^2)	OR [95%CI]
A	67,9%	32	44,4%	40	55,6%	0,09	0,5 [0,22-1,14]
G	32,1%	21	61,8%	13	38,2%		2,02 [0,88-4,65]

Bei der Analyse der väterlichen Transmission zeigte sich keine Tendenz zu einer vermehrten Transmission oder Nicht-Transmission eines der Allele.

Tabelle 36: Väterliche Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Basedow-Familien

		Väter (n = 53)					
		T		NT			
Allel	Frequenz	n	Frequenz	n	Frequenz	p-Wert (χ^2)	OR [95% CI]
A	70,8%	36	48,0%	39	52,0%	0,52	0,76 [0,33-1,77]
G	29,2%	17	54,8%	14	45,2%		1,32 [0,57-3,06]

3.5.1 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Basedow-Familien und HLA-Risiko der Eltern

In dieser Analyse wurde die Transmission der Allele „A“ und „G“ in Zusammenhang mit den elterlichen HLA-Risikoallelen betrachtet. Die 54 Familien wurden in zwei Risikogruppen eingeteilt: Der als „DQ2⁺“ bezeichneten Gruppe wurden Eltern(teile) mit dem HLA-Risikoallel DQ2 (DQA1*0501-DQB1*0201) zugeordnet, der Gruppe „DQ2⁻“ Eltern(teile), die das Allel DQ2 nicht tragen.

Ergebnisse

Die Transmission der Allele "A" und "G" von Eltern auf betroffene Kinder zeigte in keiner der Gruppen signifikante Unterschiede.

Tabelle 37: Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Basedow-Familien in Zusammenhang mit HLA-Allelen

Eltern (n = 158)	Allel	Frequenz	T		NT		p-Wert (χ^2)	OR [95% CI]
			n	Frequenz	n	Frequenz		
DQ2 ⁺ (n = 30)	A	69,2%	39	47,0%	44	53,0%	0,32	0,68 [0,31-1,48]
	G	30,8%	21	56,8%	16	43,2%		1,48 [0,68-3,24]
DQ2 ⁻ (n = 49)	A	65,3%	59	46,1%	69	53,9%	0,13	0,64 [0,35-1,15]
	G	34,7%	39	57,4%	29	42,6%		1,57 [0,87-2,85]

Auch bei der separaten Betrachtung der Vererbung von Mutter auf betroffenes Kind zeigten sich keine Unterschiede in der Transmission oder Nicht-Transmission der Allele.

Tabelle 38: Mütterliche Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Basedow-Familien in Zusammenhang mit HLA-Allelen

Mütter (n = 69)	Allel	Frequenz	T		NT		p-Wert (χ^2)	OR [95% CI]
			n	Frequenz	n	Frequenz		
DQ2 ⁺ (n = 26)	A	76,9%	19	47,5%	21	52,5%	0,51	0,65 [0,17-2,40]
	G	23,1%	7	58,3%	5	41,7%		1,55 [0,41-5,75]
DQ2 ⁻ (n = 43)	A	66,3%	25	43,9%	32	56,1%	0,11	0,48 [0,19-1,19]
	G	33,7%	18	62,1%	11	37,9%		2,09 [0,84-5,22]

Ergebnisse

Die Transmission von Vätern auf betroffene Kinder zeigte keine Tendenz zu einer häufigeren Transmission eines der Allele, weder in der DQ2⁺ noch in der DQ2⁻ Gruppe.

Tabelle 39: Väterliche Transmission und Nicht-Transmission des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Basedow-Familien in Zusammenhang mit HLA-Allelen

Väter (n = 69)	Allel	Frequenz	T		NT		p-Wert (χ^2)	OR [95% CI]
			n	Frequenz	n	Frequenz		
DQ2 ⁺ (n = 26)	A	67,3%	16	45,7%	19	54,3%	0,37	0,59 [0,18-1,92]
	G	32,7%	10	58,8%	7	41,2%		1,70 [0,52-5,52]
DQ2 ⁻ (n = 43)	A	53,5%	15	32,6%	31	67,4%	0,49	0,21 [0,08-0,51]
	G	46,5%	28	70,0%	12	30,0%		4,82 [1,97-11,82]

3.6 Morbus Addison

Es wurden 195 deutsche Patienten mit Morbus Addison und 227 gesunde deutsche Kontrollen auf den IFIH1-Polymorphismus rs1990760 hin untersucht.

Bei der Genotypenverteilung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

Tabelle 40: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Patienten mit Morbus Addison gegenüber Kontrollen

Genotyp	Patienten (n = 195)		Kontrollen (n = 227)		p-Wert (χ^2)
	n	Frequenz	n	Frequenz	
AA	68	34,9%	87	38,4%	0,70
AG	99	50,8%	112	49,3%	
GG	28	14,3%	28	12,3%	

Die Allele „A“ und „G“ zeigten bei Patienten und Kontrollen keine statistisch unterschiedliche Verteilung.

Tabelle 41: Allelfrequenzanalyse des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Patienten mit Morbus Addison gegenüber Kontrollen

Allel	Patienten		Kontrollen		p-Wert (χ^2)	OR [95%CI]
	n	Frequenz	n	Frequenz		
A	235	60,3%	286	63,0%	0,46	0,89 [0,67-1,18]
G	155	39,7%	168	37,0%		1,12 [0,85-1,48]

3.6.1 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Morbus Addison im Zusammenhang mit dem HLA-Risiko

HLA-DQ2 und -DQ8 sind im genetischen Hintergrund des Morbus Addison ein wesentlicher Risikofaktor. Daher wurde auch bei der Untersuchung der Patienten mit Morbus Addison im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine Subgruppenanalyse des IFIH1-rs1990760 Polymorphismus nach HLA-Risikogruppen durchgeführt.

In keiner der durch HLA-Typen definierten Gruppen fanden sich signifikante Unterschiede in der Verteilung der Genotypen.

Ergebnisse

Tabelle 42: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen bei Patienten mit Morbus Addison gegenüber Kontrollen

HLA DQ-Allel	Genotyp	Patienten		Kontrollen		p-Wert (X ²)
		n	Frequenz	n	Frequenz	
DQ2 ⁺ und/oder DQ8 ⁺		Patienten (n = 95)		Kontrollen (n = 45)		0,37
	AA	38	40,0%	17	37,8%	
	AG	48	50,5%	20	44,4%	
	GG	9	9,5%	8	17,8%	
DQ x/x		Patienten (n = 33)		Kontrollen (n = 43)		0,46
	AA	11	33,3%	18	41,9%	
	AG	17	51,5%	22	51,1%	
	GG	5	15,2%	3	7,0%	
DQ2 ⁺		Patienten (n = 72)		Kontrollen (n = 31)		0,29
	AA	26	36,1%	11	35,5%	
	AG	38	52,8%	13	41,9%	
	GG	8	11,1%	7	22,6%	
DQ2 ⁻		Patienten (n = 56)		Kontrollen (n = 57)		0,79
	AA	23	41,1%	24	42,1%	
	AG	27	48,2%	29	50,9%	
	GG	6	10,7%	4	7,0%	
DQ8 ⁺		Patienten (n = 37)		Kontrollen (n = 20)		0,39
	AA	17	45,9%	7	35,0%	
	AG	17	45,9%	9	45,0%	
	GG	3	8,2%	4	20,0%	
DQ8 ⁻		Patienten (n = 91)		Kontrollen (n = 68)		0,73
	AA	32	35,2%	28	41,2%	
	AG	48	52,7%	33	48,5%	
	GG	11	12,1%	7	10,3%	

Die Allelverteilungen des IFIH1-rs1990760 Polymorphismus zeigten in den nach HLA-Typen unterteilten Subgruppen ebenfalls keinen Unterschied zwischen an Morbus Addison erkrankten Patienten und gesunden Kontrollen.

Ergebnisse

Tabelle 43: Allelfrequenzanalyse des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen bei Patienten mit Morbus Addison gegenüber Kontrollen

HLA DQ- Allel	Allel	Patienten (n = 95)		Kontrollen (n = 45)		p-Wert (χ^2)	OR [95% CI]
		n	Frequenz	n	Frequenz		
DQ2+ und/oder DQ8+		Patienten (n = 95)		Kontrollen (n = 45)		0,47	
	A	124	65,3%	54	60,0%		1,25 [0,75-2,1]
	G	66	34,7%	36	40,0%		0,80 [0,48-1,34]
DQ x/x		Patienten (n = 33)		Kontrollen (n = 43)		0,37	
	A	39	59,1%	58	67,4%		0,70 [0,36-1,36]
	G	27	40,9%	28	32,6%		1,43 [0,74-2,79]
DQ2+		Patienten (n = 72)		Kontrollen (n = 31)		0,51	
	A	90	62,5%	35	56,5%		1,29 [0,70-2,35]
	G	54	37,5%	27	43,5%		0,78 [0,42-1,42]
DQ2-		Patienten (n = 56)		Kontrollen (n = 57)		0,81	
	A	73	65,2%	77	67,5%		0,90 [0,52-1,56]
	G	39	34,8%	37	32,5%		1,11 [0,64-1,93]
DQ8+		Patienten (n = 37)		Kontrollen (n = 20)		0,31	
	A	51	68,9%	23	57,5%		1,64 [0,74-3,64]
	G	23	31,1%	17	42,5%		0,61 [0,27-1,35]
DQ8-		Patienten (n = 91)		Kontrollen (n = 68)		0,55	
	A	112	61,5%	89	65,4%		0,84 [0,53-1,34]
	G	70	38,5%	47	34,6%		1,18 [0,75-1,88]

3.6.2 IFIH1-Polymorphismus rs1990760 bei Morbus Addison bei männlichen und weiblichen Individuen

Die Patienten mit Morbus Addison wurden nach ihren HLA-Typen und dem Geschlecht zu Subgruppen zusammengefasst. Die Genotypenverteilung war in keiner der gebildeten Untergruppen signifikant unterschiedlich.

Ergebnisse

Tabelle 44: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen und Geschlecht bei Patientinnen mit Morbus Addison gegenüber weiblichen Kontrollen

HLA DQ-Allel/ Geschlecht	Genotyp					p-Wert (χ^2)
		n	Frequenz	n	Frequenz	
DQ2+ und/oder DQ8+ weiblich		Patienten (n = 64)		Kontrollen(n = 24)		0,77
	AA	27	42,2%	9	37,5%	
	AG	32	50,0%	12	50,0%	
	GG	5	7,8%	3	12,5%	
DQ x/x weiblich		Patienten (n = 22)		Kontrollen (n = 25)		0,26
	AA	7	31,8%	13	52,0%	
	AG	12	54,6%	11	44,0%	
	GG	3	13,6%	1	4,0%	
DQ2+/ weiblich		Patienten (n = 45)		Kontrollen (n = 18)		0,81
	AA	17	37,8%	7	38,9%	
	AG	23	51,1%	8	44,4%	
	GG	5	11,1%	3	16,7%	
DQ2-/ weiblich		Patienten (n = 41)		Kontrollen (n = 31)		0,69
	AA	17	41,5%	15	48,4%	
	AG	21	51,2%	15	48,4%	
	GG	3	7,3%	1	3,2%	
DQ8+/ weiblich		Patienten (n = 27)		Kontrollen (n = 7)		0,69
	AA	12	44,4%	2	28,6%	
	AG	13	48,2%	4	57,1%	
	GG	2	7,4%	1	14,3%	
DQ8-/ weiblich		Patienten (n = 59)		Kontrollen (n = 42)		0,56
	AA	22	37,3%	20	47,7%	
	AG	31	52,5%	19	45,2%	
	GG	6	10,2%	3	7,1%	

Ergebnisse

Tabelle 45: IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen und Geschlecht bei männlichen Patienten mit Morbus Addison gegenüber männlichen Kontrollen

HLA DQ-Allel/ Geschlecht	Genotyp					p-Wert (χ^2)
		n	Frequenz	n	Frequenz	
DQ2 ⁺ und/oder DQ8 ⁺ männlich		Patienten (n = 28)		Kontrollen (n = 21)		0,67
	AA	11	39,3%	8	38,1%	
	AG	13	46,4%	8	38,1%	
	GG	4	14,3%	5	23,8%	
DQ x/x männlich		Patienten (n = 9)		Kontrollen (n = 18)		0,65
	AA	3	33,3%	5	27,8%	
	AG	4	44,5%	11	61,1%	
	GG	2	22,2%	2	11,1%	
DQ2 ⁺ / männlich		Patienten (n = 24)		Kontrollen (n = 13)		0,40
	AA	9	37,5%	4	30,8%	
	AG	12	50,0%	5	38,4%	
	GG	3	12,5%	4	30,8%	
DQ2 ⁻ / männlich		Patienten (n = 13)		Kontrollen (n = 26)		0,55
	AA	5	38,5%	9	34,6%	
	AG	5	38,5%	14	53,9%	
	GG	3	23,0%	3	11,5%	
DQ8 ⁺ / männlich		Patienten (n = 10)		Kontrollen (n = 13)		0,69
	AA	5	50,0%	5	38,5%	
	AG	4	40,0%	5	38,5%	
	GG	1	10,0%	3	23,0%	
DQ8 ⁻ / männlich		Patienten (n = 27)		Kontrollen (n = 26)		0,91
	AA	9	33,3%	8	30,8%	
	AG	13	48,2%	14	53,8%	
	GG	5	18,5%	4	15,4%	

Ergebnisse

Auch bei der Distribution der Allele „A“ und „G“ war kein Unterschied in den gebildeten Subgruppen erkennbar.

Tabelle 46: Allelfrequenzanalyse des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen und Geschlecht bei Patientinnen mit Morbus Addison gegenüber weiblichen Kontrollen

HLA DQ- Allel/ Ge- schlecht	Allel				p-Wert (χ^2)	Odds-Ratio [95% CI]	
	n	Frequenz	n	Frequenz			
DQ2+und/ oder DQ8+ weiblich	Patienten (n = 64)		Kontrollen (n = 24)		0,69		
	A	86	67,2%	30		62,5%	1,23 [0,62-2,45]
	G	42	32,8%	18		37,5%	0,81 [0,41-1,62]
DQ x/x weiblich	Patienten (n = 22)		Kontrollen (n = 25)		0,19		
	A	26	59,1%	37		74,0%	0,51 [0,21-1,21]
	G	18	40,9%	13		26,0%	1,97 [0,82-4,71]
DQ2+/ weiblich	Patienten (n = 45)		Kontrollen (n = 18)		0,99		
	A	57	63,3%	22		61,1%	1,10 [0,5-2,44]
	G	33	26,7%	14		38,9%	0,91 [0,41-2,02]
DQ2-/ weiblich	Patienten (n = 41)		Kontrollen (n = 31)		0,60		
	A	55	67,1%	45		72,6%	0,77 [0,37-1,59]
	G	27	32,9%	17		27,4%	1,30 [0,63-2,68]
DQ8+/ weiblich	Patienten (n = 27)		Kontrollen (n = 7)		0,63		
	A	37	68,5%	8		57,1%	1,63 [0,49-5,44]
	G	17	31,5%	6		42,9%	0,61 [0,18-2,04]
DQ8-/ weiblich	Patienten (n = 59)		Kontrollen (n = 42)		0,40		
	A	75	63,6%	59		70,2%	0,74 [0,41-1,35]
	G	43	36,4%	25		29,8%	1,35 [0,74-2,46]

Ergebnisse

Tabelle 47: Allelfrequenzanalyse des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 in Zusammenhang mit HLA-Allelen und Geschlecht bei männlichen Patienten mit Morbus Addison gegenüber männlichen Kontrollen

HLA DQ- Allel/ Ge- schlecht	Allel					p-Wert (χ^2)	Odds-Ratio [95% CI]
		n	Frequenz	n	Frequenz		
DQ2 ⁺ und/ oder DQ8 ⁺ männlich		Patienten (n = 28)		Kontrollen (n = 21)		0,74	
	A	35	62,5%	24	57,1%		1,25 [0,55-2,38]
	G	21	37,5%	18	42,9%		0,80 [0,35-1,81]
DQ x/x männlich		Patienten (n = 9)		Kontrollen (n = 18)		0,92	
	A	10	55,6%	21	58,3%		0,89 [0,29-2,80]
	G	8	44,4%	15	41,7%		1,12 [0,36-3,51]
DQ2 ⁺ / männlich		Patienten (n = 24)		Kontrollen (n = 13)		0,43	
	A	30	62,5%	13	50,0%		1,67 [0,63-4,38]
	G	18	37,5%	13	50,0%		0,60 [0,23-1,58]
DQ2 ⁻ / männlich		Patienten (n = 13)		Kontrollen (n = 26)		0,93	
	A	15	57,7%	32	61,5%		0,85 [0,33-2,22]
	G	11	42,3%	20	38,5%		1,17 [0,45-3,06]
DQ8 ⁺ / männlich		Patienten (n = 10)		Kontrollen (n = 13)		0,58	
	A	14	70,0%	15	57,7%		1,71 [0,50-5,87]
	G	6	30,0%	11	42,3%		0,58 [0,17-2,01]
DQ8 ⁻ / männlich		Patienten (n = 27)		Kontrollen (n = 26)		0,87	
	A	31	57,4%	30	57,7%		0,99 [0,46-2,14]
	G	23	42,6%	22	42,3%		1,01 [0,47-2,19]

4 Diskussion

Das angeborene Immunsystem nimmt die Anwesenheit mikrobieller Infektion durch PRRs wahr, die für die Angreifer typische Strukturelemente erkennen. Zu den Sensormolekülen des angeborenen Immunsystems im Zytosol infizierter Zellen zählen TLR-3 und cytoplasmatische Helicasen wie RIG-1 und IFIH1. Sie detektieren zytosolische dsRNA, die bei der Replikation der Viren entsteht, und triggern antivirale und apoptotische Signalwege. IFIH1 aktiviert mit seiner CARD über Transkriptionsfaktoren und IRFs Nf- κ B-Signalwege, die ihrerseits INF α/β und damit Interferon-induzierbare Gene aktivieren [Kawai *et al.*, 2008].

Die physiologische Rolle des IFIH1-Proteins liegt also in der antiviralen Antwort des angeborenen Immunsystems. Wenn Veränderungen in Signalwegen der Virusabwehr assoziiert sind mit dem Auftreten oder Nicht-Auftreten von Autoimmunerkrankungen, würde dies den Zusammenhang zwischen Autoimmunerkrankungen und Infektionen, in diesem Falle viralen Infektionen, bestätigen und einen funktionellen Zusammenhang nahe legen. Beziehungen zwischen Autoimmunopathien und viralen Infektionen sind auf unterschiedlichen Ebenen vielfach beschrieben [Knip *et al.*, 2005; Werf *et al.*, 2007; Desalloud *et al.*, 2009].

Eine Genom-weite Assoziationsstudie hat den IFIH1-Polymorphismus rs1990760 als Risikofaktor für T1Ds identifiziert [Smyth *et al.*, 2006]. Die Assoziation des in dieser Arbeit untersuchten IFIH1-Polymorphismus rs1990760 mit T1D wurde in mehreren Studien mit unterschiedlichen Populationen bestätigt [Qu *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009]. Drei andere Polymorphismen im IFIH1-Gen bzw. nahe seinem 3'-Ende (rs13422767, rs2111485 und rs3747517) zeigten in einer Studie mit 2046 kaukasischen Patienten gegenüber 2417 Kontrollen eine Assoziation mit T1D, die stärkste Assoziation wurde auch in dieser Studie für den IFIH1-rs1990760 Polymorphismus beobachtet [Liu *et al.*, 2009]. Eine andere Untersuchung machte Funktionsverlust-Mutationen

(„Loss-of-function“-Mutationen) an anderen Positionen im Gen der Helicase als protektiv gegen T1D aus [Shigemoto *et al.*, 2009].

Der rs1990760-Polymorphismus liegt in der HNF3b- Bindestelle im Exon 15 und kodiert ein Alanin zu Threonin im Codon 946 (Ala946Thr). Ala946 ist das häufigere Allel, Threonin das seltenere. Der Polymorphismus liegt weder in der CARD-Region noch in der Helicase-Domäne. Die Region, in der er liegt, ist hochkonserviert bei Säugern. Sie könnte bisher unbekannt Funktionen durch Effekte auf die Tertiärstruktur haben [Smyth *et al.*, 2006].

Der Genort ist in der Folge auch in den Fokus bei der Erforschung anderer Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose und Rheumatoide Arthritis gelangt [Martinez *et al.*, 2008a; Martinez *et al.*, 2008b]. In der vorliegenden Arbeit wurde er auf Assoziationen mit Hashimoto-Thyreoditis, Morbus Basedow und Morbus Addison hin untersucht.

Bei Vorhandensein mehrerer Risikofaktoren sind additive Effekte auf das Risiko, an einer dieser Autoimmunendokrinopathien zu erkranken, denkbar. Gleichzeitig aber kann ein starker Risikofaktor den Einfluss eines schwächeren Risikofaktors überdecken. Solche lang bekannten, deutlichen Risikofaktoren bei den bislang untersuchten Autoimmunendokrinopathien sind unter anderen genetischen Anfälligkeitsmerkmalen im HLA-Komplex zu finden. Daher wurden in dieser Studie Genotypen, Allelhäufigkeiten und Transmissionen des IFIH1-Polymorphismus gemeinsam mit den HLA-Typen betrachtet.

Ein genetischer Hintergrund zur Anfälligkeit für Autoimmunerkrankungen ist allgemein anerkannt. Veränderungen in verschiedenen Genregionen gelten als prädisponierende Faktoren, sie erhöhen somit das Risiko zu erkranken. Die Kenntnis dieser genetischen Faktoren kann helfen, mehr über die Pathogenese der Krankheit zu lernen. Nicht immer sind die funktionellen Folgen einer Veränderung bekannt, jedoch geben sie Hinweise auf die beteiligten Systeme und Signalwege und können Ansatzpunkte zur Entwicklung neuer Therapien geben.

Im genetischen Hintergrund autoimmuner Endokrinopathien lassen sich deutliche Überschneidungen erkennen. Mehrere Genorte beeinflussen in unterschiedlich starkem Maße das Risiko für die verschiedenen Krankheiten

wie Morbus Basedow, Morbus Addison, Hashimoto-Thyreoditis und eben auch T1D.

So prädisponieren zum Beispiel Veränderungen im Bereich der Gene CTLA-4 [Gough *et al.*, 2006; Nithiyananthan *et al.*, 2002] und PTPN22 [Kim *et al.*, 2005; Saccucci *et al.*, 2008; Kahles *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2007; Smyth *et al.*, 2004] für Typ-1-Diabetes, autoimmune Schilddrüsenerkrankungen und für Autoimmunität im Allgemeinen. Beide Gene spielen eine Rolle in T-Zell-Signalwegen, die Krankheitsassoziationen können somit auch funktionell mit der Pathogenese in Zusammenhang gebracht werden.

Ein funktioneller Zusammenhang zwischen Hashimoto-Thyreoditis und IFIH1 erschließt sich nicht direkt über die für die gewebserstörenden Prozesse verantwortlichen zytotoxischen T-Zellen. IFIH1 ist eher ein Protein des angeborenen Immunsystems, hat also erst nach einigen nachfolgenden Schritten in der Reaktionskaskade einen Einfluss auf Aktivierung oder Nicht-Aktivierung von T-Zellen. Eine relativ direkte Folge der Aktivierung der Signalkaskade nach Kontakt zu dsRNA im Zytosol ist jedoch die vermehrte Produktion von IFN1. Synthetisches IFN wird zur Behandlung von Hepatitis C und anderen viralen Erkrankungen eingesetzt und zeigt als häufige Nebenwirkung bei bis zu 40% der behandelten Patienten eine Thyreoditis. Im klinischen Erscheinungsbild kann diese INF-induzierte Thyreoditis der Hashimoto-Thyreoditis ähnlich sein, sich aber auch eher wie ein Morbus Basedow äußern oder eine nicht-autoimmune, destruktive Form ausbilden. Die mögliche Induktion von Thyreoditiden durch INF lässt also einen eventuellen Zusammenhang der INF-Signalkaskaden und der Entstehung von Autoimmunität der Schilddrüse erkennen [Tomer *et al.*, 2009].

Der epidemiologische Zusammenhang der Inzidenz des T1D und enteroviraler Infektionen [Lonnot *et al.*, 2000] nährt die Vermutung, dass IFIH1-Veränderungen als molekulares Bindeglied zwischen einem spezifischen viralen Trigger und der autoimmunen Antwort fungieren könnten.

4.1 Hashimoto-Thyreoiditis und der IFIH1-Polymorphismus rs1990760

Die Manifestation der Hashimoto-Thyreoiditis ist multifaktoriell bedingt, sowohl genetische als auch exogene Faktoren sind an der Pathogenese und Ätiologie beteiligt. Auf Seiten der exogenen Faktoren sind ein geringes Geburtsgewicht, eine lange Reproduktionsphase [Prummel *et al.*, 2004], Infektionen mit EBV [Vrbikova *et al.*, 1996], HTLV [Kawai *et al.*, 1996] und anderen Erregern, die Aufnahme hoher Dosen Jod [Rink *et al.*, 1999] und Medikamenteneinnahme (IL-2, IFN α) [Prummel *et al.*, 2004] zu nennen. Die genetische Seite spiegelt sich im familiär gehäuften Auftreten wider. Außerdem sind verschiedene Genloci mit der Manifestation von Hashimoto-Thyreoiditis assoziiert. So sind Veränderungen im CTLA-4-Gen, dem Gen PTPN22 und dem Tg-Gen bei Erkrankten signifikant häufiger zu beobachten als bei gesunden Kontrollen [Jacobson und Tomer, 2007a]. Im Bereich der HLA-Region, die bei Autoimmunität eine besondere Rolle spielt, ist es besonders der Haplotyp DQ2, der im genetischen Hintergrund der Hashimoto-Thyreoiditis als prädisponierender Faktor erscheint [Segni *et al.*, 2002]. Ist ein Individuum durch ein Risiko-HLA-Allel belastet, kommen andere Risikofaktoren möglicherweise nicht zum Tragen. Additive Effekte, die sich bei Anwesenheit eines Risiko-Allels in der HLA-Region äußern, wären ebenfalls denkbar und müssen bei der Suche nach Assoziationen anderer Kandidatengene berücksichtigt werden.

Zur Routinediagnostik bei Verdacht auf Hashimoto-Thyreoiditis gehört die Bestimmung der Autoantikörper gegen TPO und Tg. Welche Rolle die Antikörper gegen Tg und TPO bei der Pathogenese spielen, ist allerdings nicht abschließend geklärt. TPO ist ein Schlüsselenzym bei der Bildung von Schilddrüsenhormonen und eines der Hauptantigene bei autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen. Tg dient zur Speicherung der Schilddrüsenhormone 3,5,3',5'-Tetraiodthyronin (= Thyroxin, T4) und 3,5,3'-Trijodthyronine in den Schilddrüsenfollikeln [Classen, 2009]. Die Antikörper gegen TPO und/oder Tg sind bei 10-18% der Bevölkerung nachweisbar [Bülow Pedersen *et al.*, 2003;

Hollowell *et al.* 2002] ohne dass klinisch eine Schilddrüsenerkrankung vorliegt. Die Präsenz der Antikörper ist höher in Jodmangelgebieten [Fenzi *et al.*, 1986; Aghini-Lombardi *et al.*, 1999] und nimmt mit dem Alter zu, bis sie ein Plateau erreicht oder sogar absinkt [Hawkins *et al.*, 1980; Tunbridge *et al.*, 1977]. Außerdem können sie häufiger bei Frauen als bei Männern nachgewiesen werden [Turnbridge *et al.*, 1977; Okamura *et al.*, 1987; Brochmann *et al.*, 1988; Prentice *et al.*, 1990]. In Familien, in denen ein Mitglied an Hashimoto-Thyreoditis oder Morbus Basedow erkrankt ist, ist die Zahl der Antikörperpositiven, aber euthyreoten Individuen höher als in der Allgemeinbevölkerung [Prummel *et al.*, 2005]. Die Anwesenheit und der Titer der Antikörper an sich korreliert nur in geringem Ausmaß mit der Schilddrüsen-Destruktion [Pearce *et al.*, 2003]. Heute wird davon ausgegangen, dass sie bei bereits laufendem Entzündungsvorgang einen Beitrag zur Potenzierung der Reaktion leisten, die alleinige Anwesenheit aber nicht zur Manifestation der Erkrankung ausreicht [Weetman *et al.*, 1994]. In der vorliegenden Arbeit wurde der elterliche Antikörperstatus in die Untersuchung einbezogen. Denn es ist bekannt, dass die mütterliche Schilddrüsenfunktion Fertilität, Wachstum, neuroendokrine Entwicklung des Fetus [Pop *et al.*, 1995] und die perinatale Mortalität [Männistö *et al.*, 2009] beeinflussen kann. Bei Männern deuten Schilddrüsenautoimmunität und andere organ-spezifische Antikörper auf eine allgemeine Immundysregulation hin und können ebenfalls die Fertilität beeinflussen [Baker *et al.* 1985; Paschke *et al.*, 1994]. Bei einem Antikörperpositiven Individuum können sie ein Prädiktor für die Entwicklung einer autoimmunen Schilddrüsenerkrankung sein und weisen möglicherweise auf eine subklinische Hypothyreose hin [Prummel *et al.*, 2005].

Die oben beschriebenen Komponenten der Ätiologie und Pathogenese stellen den Hintergrund für die in dieser Arbeit gebildeten Subgruppen. Im Fokus stand zunächst die Gesamtgruppe. Hier wurden die Genotypen- und Allelfrequenzen des Polymorphismus rs1990760 von 106 Patienten mit Hashimoto-Thyreoditis aus Deutschland mit 227 gesunden Probanden aus Deutschland verglichen. Bei der Patienten-Kontrollanalyse zeigten sich keine Präferenzen zugunsten eines

Genotyps oder eines Allels, eine Assoziation des Polymorphismus konnte also bei der Gesamtgruppe nicht nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse stimmen mit einer Studie aus Japan, die 174 an Hashimoto-Thyreoditis erkrankte japanische Patienten mit entsprechenden Kontrollen verglich, überein. Auch dort konnten keine Assoziationen des rs1990760-Polymorphismus mit Hashimoto-Thyreoditis ermittelt werden [Ban *et al.*, 2010]. Auffällig war eine abweichende Allelhäufigkeit in der japanischen gegenüber der kaukasischen Population: Während in der japanischen Studie das Allel „G“ mit 77% deutlich häufiger als das Allel „A“ mit 23% auftrat, zeigten europäische Studien gegenläufige Allelverteilungen. In kaukasischen Populationen ist das Verhältnis A:G ca. 60:40 anzunehmen [Smyth *et al.*, 2006; Sutherland *et al.*, 2007]. Eine ähnliche Allelverteilung findet sich auch in der hier untersuchten deutschen Population wieder, in der das Allel „A“ bei 63% der gesunden Kontrollen, das Allel „G“ bei 37% nachweisbar war.

Um eventuell verdeckte Effekte zu erkennen, wurde die Gesamtgruppe nach ihrem HLA-Haplotypen in Untergruppen geteilt. Jedoch konnte weder in den Subgruppen mit hohem Risiko durch HLA-DQ2 noch in der DQ2-negativen Gruppe eine Assoziation gefunden werden. Eine Bevorzugung des weiblichen Geschlechts bei der Erkrankung an Hashimoto-Thyreoditis legte die geschlechtergetrennte Untersuchung nahe. Die Patienten und Kontrollen wurden nach HLA-Risiko und Geschlecht auf Subgruppen verteilt, die jedoch ebenfalls keine Assoziationen aufwiesen.

Bei Fall-Kontroll-Studien kann nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden, dass die Kontrollgruppe nicht repräsentativ für die Gesamtpopulation ist. Fall-Kontroll-Studien sind bei der Untersuchung von Polymorphismus-Krankheitsassoziationen weniger sensitiv, wenn die Kontrollgruppe inadäquat randomisiert ist. In Familienanalysen wird die Transmission der Allele an betroffene Kinder untersucht, die nicht transmittierten Allele gelten dann als interne Kontrollgruppe und das Problem der inadäquaten Randomisierung wird so umgangen.

Auch in der Familienanalyse der 149 italienischen Familien mit einem an Hashimoto-Thyreoditis erkrankten Kind zeigten sich in der Gesamtgruppe keine

Unterschiede im Transmissionsverhalten der Allele. Auch hier wurde eine Stratifizierung nach HLA-bedingtem Risiko vorgenommen. Familien, in denen die Eltern den Haplotyp HLA-DQ2 trugen, wurden getrennt von den Familien beobachtet, in denen die Eltern diesen HLA-Haplotyp nicht trugen. Während die HLA-DQ2-negative Gruppe ein ausgeglichenes Transmissionsverhältnis zeigte, war in der HLA-DQ2-positiven Gruppe eine Tendenz zu erkennen, dass das seltenere Allel „G“ auch seltener vererbt wurde (55,1% Nicht-Transmission zu 44,9% Transmission, $p = 0,09$).

Dieser Trend fand sich in der Untersuchung der rein maternalen Vererbung verstärkt wieder (59,6% Nicht-Transmission zu 40,4% Transmission, $p = 0,06$). In der paternalen Transmissionsanalyse war dieser Trend nicht zu beobachten. Da erst ab einem p -Wert $\leq 0,05$ im χ^2 -Test von statistischer Relevanz ausgegangen wird, sind die beobachteten Trends nicht klar genug, um eine abschließende Aussage zu treffen. Hierzu wäre die Analyse von größeren Fallzahlen nötig, diese standen jedoch nicht zur Verfügung.

Falls sich der Trend durch weitere Untersuchungen bestätigen sollte, könnte das Ergebnis auf das Phänomen der genomischen Prägung (genomic imprinting) zurückgeführt werden. Genomische Prägung beschreibt, dass gleiche Allele paternaler und maternaler Gene unterschiedlich exprimiert werden. Funktion und physiologische Relevanz eines Gens bei einem betroffenen Kind hängen dann also davon ab, ob es von der Mutter oder vom Vater vererbt wird. Auf molekularer Ebene spielen bei diesem Phänomen Unterschiede im Methylierungsmuster im Genom sich differenzierender Zellen eine Rolle [Löffler und Petrides, 2002].

Vor dem Hintergrund der Schilddrüsenantikörper als weiterem Indikator für eine familiäre Anfälligkeit für autoimmune Thyreopathien wurden der elterliche Antikörperstatus in den Familien mit an Hashimoto-Thyreoditis erkranktem Kind bei der Assoziationsanalyse des IFIH1-Polymorphismus einbezogen. In den Familien, in denen weder Mutter noch Vater positiv für Schilddrüsenantikörper (TPO-Ak, Tg-Ak) waren, zeigten sich keine Unterschiede in der Vererbung der Allele des IFIH1-Polymorphismus rs1990760. Waren nur bei der Mutter oder nur beim Vater Antikörper nachzuweisen, zeigten sich ebenfalls keine

Vererbungsunterschiede. In der Gruppe, in der Vater und Mutter einen positiven Antikörperbefund aufwiesen, war eine häufigere Transmission des Allels „A“ auf das betroffene Kind zu beobachten (61,8% vs. 38,2%; $p = 0,05$).

Eine Erklärung für diese Beobachtung ist, dass Familienanalysen eine höhere Sensitivität und Spezifität besitzen als Fall-Kontroll-Analysen. Auch scheint der zur Autoimmunität prädisponierende Effekt des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 sich in den verschiedenen Populationen deutlich zu unterscheiden [Jermendy *et al.* 2010]

4.2 Morbus Basedow und der IFIH1-Polymorphismus rs1990760

Wechselbeziehungen von autoimmunen Endokrinoopathien und Infektionen sind in der Einleitung bereits beschrieben worden. Die Betrachtung einzelner Signalwege in der Immunantwort auf Erreger ist ein Baustein in der Erforschung dieser Beziehungen.

In der Entstehung von T1D gilt ein Zusammenhang mit (entero-)viralen Infektionen als wahrscheinlich [Lonntot *et al.*, 2000], so dass die an der Virusabwehr beteiligte Helicase IFIH1 eine molekulare Brücke zwischen viraler Infektion und autoimmunen Prozessen darstellen könnte [Smyth *et al.*, 2006]. Für Morbus Basedow sind die Zusammenhänge zwischen Infektionen und der Manifestation der Autoimmunopathie nicht so deutlich, jedoch könnte IFIH1 abgesehen von seiner Funktion als viraler Rezeptor weitere immunregulatorische Effekte haben.

Morbus Basedow ist eine autoimmune Endokrinoopathie, deren Ursprung in bis zu 90% der Fälle der genetisch determinierten Anfälligkeit zugeschrieben wird [Brix *et al.*, 2001]. HLA-Variationen und damit die Antigenbindungsaffinität besonders der HLA-Klasse II-Moleküle spielen eine wesentliche Rolle bei der Stimulation von T-Lymphozyten und der Entwicklung von

Autoimmunerkrankungen. Der DQ2-Haplotyp ist ein solches Risikoallel für Morbus Basedow in der HLA-Region [Ramos-Lopez *et al.*, 2007]. Neben der HLA-Region spielen andere Gene und ihre Varianten eine Rolle in der Anfälligkeit für Morbus Basedow. Hierzu zählt auch das an der Pathogenese mehrerer endokriner Autoimmunopathien beteiligte Protein CTLA-4. CTLA-4 ist ein Regulatorprotein im Aktivierungsprozess von T-Zellen, dessen Variationen in zahlreichen Studien Assoziationen zu Morbus Basedow zeigten [Yanagawa *et al.*, 1995; Nistico *et al.*, 1996; Donner *et al.*, 2003; Heward *et al.*, 1997; Allahabadi *et al.*, 2001]. Ein weiteres Gen, das mit Morbus Basedow assoziiert ist, ist das Vitamin-D-Rezeptor-Gen [Ban *et al.*, 2000a; Ban *et al.*, 2000b]. Der Vitamin D-Rezeptor ist ein nuklearer Rezeptor, der die Genexpression durch direkte Interaktion mit spezifischen Sequenzelementen in den Promoterregionen von Hormon-abhängigen Zielgenen reguliert. Vitamin D hat nicht nur eine zentrale Rolle im Calcium- und Phosphatstoffwechsel, sondern reguliert daneben Zellwachstum und Differenzierung in unterschiedlichen Gewebetypen, ist beteiligt an Hormonregulationskreisen und moduliert das Immunsystem [Ross *et al.*, 1994; Christakos *et al.*, 1996]. Dass es eine Rolle bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen spielt, wird durch die Beobachtung gestützt, dass eine Vitamin-D-Supplementierung vor T1D-Entwicklung schützt [Hyppönen *et al.*, 2001].

Ein anderes Gen, für das Assoziationen mit Morbus Basedow gezeigt werden konnten, ist das PTPN22, dessen Produkt die Aktivierung von T-Zellen durch Interaktion mit anderen Signaltransduktionsmolekülen inhibiert [Velaga *et al.*, 2004]. Auch im Gen von CD40, dessen Protein ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie auf antigenpräsentierenden Zellen und ein wichtiger B-Zell-Costimulator ist, konnten Polymorphismen nachgewiesen werden, die eine Kopplungshäufigkeit mit dem Auftreten von Morbus Basedow zeigen [Tomer *et al.*, 1998,2002; Pearce *et al.*, 1999; Kurylowicz *et al.*, 2005].

Die Variationen der HLA-Region, CTLA-4 und PTPN22 zeigen Assoziationen mit jeweils mehreren endokrinen Autoimmunopathien und gelten so eher als allgemeine Risikofaktoren für autoimmune Erkrankungen. Der TSH-Rezeptor ist als Autoantigen krankheitsspezifisch für Morbus Basedow; Polymorphismen im

kodierenden Gen erhöhen die Anfälligkeit für Morbus Basedow, nicht aber für Hashimoto-Thyreoditis [Brand und Gough, 2010].

Die Überschneidungen im genetischen Hintergrund der meisten endokrinen Autoimmunopathien machen Gene, für die Assoziationen mit einer Erkrankung aus dieser Gruppe bekannt sind, zu Kandidatengen für andere Mitglieder der Krankheitsfamilie. Die in mehreren Studien gefundenen Assoziationen zwischen IFIH1-Polymorphismen und T1D, weckten das Interesse zu fragen, ob es auch Zusammenhänge zu Morbus Basedow gibt. In Großbritannien testeten Sutherland *et al.*, 2007 den rs199760-Polymorphismus in einer Studienpopulation von 646 Fällen mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen gegen 446 gesunde Kontrollen. In dieser Studie wurde beobachtet, dass das Allel „A“ bei 66% der Patienten vorhanden war, im Gegensatz dazu nur bei 57% der Kontrollen. Mit einem p-Wert von 0,00014 bei der Genotypenverteilung und einem p-Wert von 0,000019 bei der Allelverteilung (OR = 1,47) zeigten sich hier deutliche Assoziationen zu Morbus Basedow [Sutherland *et al.*, 2007]. In der vorliegenden Arbeit wurden 258 Patienten aus Deutschland mit 227 gesunden Kontrollen, ebenfalls aus Deutschland, verglichen. Die von Sutherland *et al.* (2007) beobachtete Assoziation konnte hier nicht wiedergefunden werden. Allelverteilungen und Genotypen waren mit p-Werten von 0,323 bzw 0,550 weit entfernt von einer statistisch nachweisbaren Assoziation eines der Allele mit dem Auftreten von Morbus Basedow. Diese Ergebnisse gleichen denen einer Studie aus China, die ebenfalls keine Assoziationen zwischen Morbus Basedow und dem IFIH1-rs1990760 Polymorphismus finden konnte [Zhao *et al.*, 2007].

Um eventuell verdeckte Effekte oder Risikopotenzierung durch einen zusätzlich vorhandenen Risikofaktor sichtbar zu machen, wurde eine Subgruppierung nach bekannten Anfälligkeitsfaktoren vorgenommen. Als die Anfälligkeit erhöhende Faktoren wurden weibliches Geschlecht und der HLA-Typ DQ2 angenommen. Weder das Geschlecht noch das HLA-bedingte Risiko hatten aber Einfluss auf die Genotypen- und Allelverteilungen des untersuchten Polymorphismus, es konnten keine Assoziationen beobachtet werden.

Der TSH-Rezeptor ist als spezifisches Autoantigen an der Pathogenese des Morbus Basedow beteiligt. Mehrere Studien haben Veränderungen im Gen des

TSH-Rezeptors gefunden, die mit der Manifestation von Morbus Basedow assoziiert sind. [Dechairo *et al.*, 2005; Hiratani *et al.*, 2005; Brand *et al.*, 2009]. Die Antikörper selbst sind bei 90% der Patienten nachweisbar [Classen, 2009] und haben aktivierende Funktion am TSH-Rezeptor. Dadurch kommt es zur Mehrsekretion von Schilddrüsenhormon und zur Hyperthyreose. In der vorliegenden Arbeit lag bei 46 von 258 Patienten ein positiver Antikörperbefund vor. Es konnte jedoch auch in dieser Subgruppe keine Assoziation des IFIH1-rs1990760 Polymorphismus mit Morbus Basedow gefunden werden.

Der systematische Vorteil von Familienanalysen (kein Risiko der inadäquaten Randomisierung) wurde in dieser Arbeit auch bei Familien mit einem an Morbus Basedow erkrankten Kind genutzt. Bei den 57 untersuchten Familien wurden keine Transmissionsunterschiede der Allele festgestellt. Bei der Subgruppierung nach väterlicher und mütterlicher Vererbung tendierte die mütterliche Transmission zu Mehrtransmission des selteneren Allels „G“ auf betroffene Kinder (61,8% Transmission zu 38,2% Nicht-Transmission, $p = 0,09$). In den Subgruppenanalysen mit Stratifizierung nach HLA-bedingtem Risiko durch das DQ2-Allel bei den Eltern war diese Tendenz jedoch nicht zu beobachten und es zeigten sich keine Transmissionsunterschiede. Dies könnte durch die geringe Anzahl der zur Verfügung stehenden Familien bedingt sein.

4.3 Morbus Addison und der IFIH1-Polymorphismus rs1990760

Der genetische Hintergrund des Morbus Addison überschneidet sich mit dem anderer autoimmuner Erkrankungen, insbesondere mit dem des T1D und autoimmuner Thyreopathien. Daher sind Gene im Hintergrund einer anderen organspezifischen endokrinen Autoimmunopathie als Kandidatengene für Morbus Addison zu betrachten. Darüber hinaus sind Patienten mit Morbus Addison zusätzlich von anderen organ-spezifischen Autoimmunopathien (50% der Fälle) betroffen oder leiden unter einem Polyendokrinen Syndrom, so dass

Gemeinsamkeiten im hereditären Bereich allgemein anerkannt sind [Myrhe *et al.*, 2002; Nerup *et al.*, 1974; Falorni *et al.*, 2004].

Es sind also auch bei Morbus Addison Variationen im Bereich der Gene CTLA-4 [Blomhoff *et al.*, 2004], PTPN22 [Skinningsrud *et al.*, 2008] und der HLA-Region, die wesentlich zur Erhöhung der Anfälligkeit beitragen. In der HLA-Region sind es besonders die Allele DQ2 und DQ8, die eine Anfälligkeit für Morbus Addison anzeigen [Myrhe *et al.*, 2002].

IFIH1 als Bestandteil des angeborenen Immunsystems mit wesentlicher Funktion in der Virusabwehr und die Assoziation mit T1D jedoch macht es zu einem Kandidatengen für Morbus Addison. Darüber hinaus agieren angeborenes und erworbenes Immunsystem gemeinsam, wobei das angeborene System die erste Reihe der Abwehr darstellt, bevor nach einigen Tagen das erworbene System mit seinen spezifischen T- und B-Zell-Klonen vorherrschend wird. Komponenten des angeborenen Immunsystems wie das Interferonsystem tragen zur Aktivierung der Antigen-spezifischen Zellen bei [Chaplin, 2010]. IFIH1 ist ein dem angeborenen Immunsystem zugeordneter Rezeptor, der über das Interferonsystem unter anderem zur Aktivierung von T-Lymphozyten und zur Bildung von MHC-Molekülen führt. Kommt es in einer solch frühen Stufe des angeborenen Immunsystems zu Dysregulationen, können sich diese in mehrschrittigen Prozessen bis in die Funktion von T- und B-Zellen fortsetzen.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit die Assoziation des IFIH1-Polymorphismus rs199760 mit Morbus Addison untersucht. Hierzu wurden 195 Patienten und 227 Kontrollen genotypisiert. Es zeigten sich keine signifikanten Frequenzunterschiede bei Patienten und Kontrollen hinsichtlich der Genotypen oder der Allele. Auch eine Subgruppierung nach HLA-bedingtem Risiko und dem Geschlecht ergab keine Assoziationen des Polymorphismus mit Morbus Addison. Die Größe der Studienpopulation von 195 untersuchten Patienten allerdings lässt keine abschließende Beurteilung möglicher Zusammenhänge zu. In Großbritannien zeigte die Studie von Sutherland *et al.* [2007] bei ähnlicher Verteilung des rs199760-Polymorphismus in der Kontrollgruppe ein übereinstimmendes Ergebnis. Die Untersuchung größerer

Studienpopulationen und die Durchführung von Familienanalysen ist hier jedoch sinnvoll.

4.4 Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass der IFIH1-Polymorphismus rs1990760 keine signifikante Rolle in der genetischen Anfälligkeit für Hashimoto-Thyreoditis, Morbus Basedow und Morbus Addison in der deutschen sowie für Hashimoto-Thyreoditis in der italienischen Bevölkerung spielt. Jedoch erfordern die beobachteten Trends in einigen der untersuchten Subgruppen weitere Untersuchungen mit größeren Studienpopulationen, um einen Effekt des IFIH1-Polymorphismus rs1990760 auf die Anfälligkeit für autoimmune Schilddrüsenerkrankungen auszuschließen. Auch andere Polymorphismen im IFIH1-LD Block (z.B. rs2068330, rs2111485 und rs984971) sind interessant für zukünftige Untersuchungen, um bessere Marker für die Anfälligkeit für Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen und Morbus Addison in der europäischen Bevölkerung zu finden.

5 Literaturverzeichnis

- **Ackerman LS:** Sex hormones and the genesis of autoimmunity. *Archives of Dermatology* 2006; **142**(3):371-376.
- **Addison T:** On the Constitutional and Local Effects of Diseases of the Supra-Renal Capsules. *Warren & Son, London, 1855.*
- **Aghini-Lombardi F, Antonangeli L, Martino E, Vitti P, Maccherini D, Leoli F, Rago T, Grasso L, Valeriano R, Balestrieri A und Pinchera A:** The spectrum of thyroid disorders in an iodine-deficient community: the Pescopagano survey. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1999; **84**(2):561-566.
- **Allahabadia A, Heward JM, Nithiyananthan R, Gibson SM, Reuser TT, Dodson PM, Franklyn JA und Gough SC:** MHC class II region, CTLA4 gene, and ophthalmopathy in patients with Graves' disease. *Lancet.* 2001; **358**(9286):984-985.
- **Anderson MS:** Update in Endocrine Autoimmunity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2008; **93**(10):3663–3670.
- **Ando T, Imaizumi M, Graves PN, Unger P und Davies TF:** Intrathyroidal fetal microchimerism in Graves' disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2002; **87**(7):3315-3320.
- **Arlt W und Allolio B:** Adrenal insufficiency. *Lancet.* 2003; **361**(9372):1881-1893.

- **Arnson Y, Shoenfeld Y und Amital H:** Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*. 2010; **34**(3):258-265.

- **Badenhoop K, Walfish PG und Usadel KH:** Susceptibility and resistance alleles of human leukocyte antigen (HLA) DQA1 and HLA DQB1 are shared in endocrine autoimmune disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1995; **80**(7):2112-2117.

- **Baker HW, Clarke GN, McGowan MP, Koh SH und Cauchi MN:** Increased frequency of autoantibodies in men with sperm antibodies. *Fertility and Sterility*. 1985; **43**(3):438-441.

- **Ban Y und Taniyama M:** Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with Graves' disease in the Japanese population. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2000a; **85**(12):4639-4643.

- **Ban Y und Tomer Y:** Susceptibility genes in thyroid autoimmunity. *Clinical and Developmental Immunology*. 2005; **12**(1):47-58.

- **Ban Y, Greenberg DA, Concepcion E, Skrabanek L, Villanueva R und Tomer Y:** Amino acid substitutions in the thyroglobulin gene are associated with susceptibility to human and murine autoimmune thyroid disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; **100**(25):15119-15124.

- **Ban Y, Taniyama M und Katagiri T:** Vitamin D receptor initiation codon polymorphism in Japanese patients with Graves' disease. *Thyroid*. 2000b; **10**(6):475-480.

- **Ban Y, Tozaki T, Taniyama M, Nakano Y, Ban Y und Hirano T:** Genomic Polymorphism in the Interferon-induced Helicase (IFIH1) Gene does not

- Confer Susceptibility to Autoimmune Thyroid Disease in the Japanese Population. *Hormone and Metabolic Research*. 2010; **42**(1):70-72.
- **Basedow CA:** Exophthalmos durch Hypertrophie des Zellgewebes in der Augenhöhle. *Wochenschrift für die gesamte Heilkunde*. 1840; **13**:197-204 und 220-228.
 - **Bauer S, Müller T und Hamm S:** Pattern recognition by Toll-like receptors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2009; **653**:15-34.
 - **Besedovsky HO und del Rey A:** Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*. 1996; **17**(1):64–102.
 - **Blackley CH:** Experimental Researches on the Causes and Nature of Catarrhus Aestivus (Hayfever or Hay-Asthma). *Bailliere, Tindall Cox, London, 1873*.
 - **Blomhoff A, Lie BA, Myhre AG, Kemp EH, Weetman AP, Akselsen HE, Huseby ES, Undlien DE:** Polymorphisms in the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene region confer susceptibility to Addison's disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2004; **89**(7):3474-3464.
 - **Bowie AG und Haga IR:** The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Molecular Immunology*. 2005; **42**(8):859-867.
 - **Brand OJ und Gough SC:** Genetics of thyroid autoimmunity and the role of the TSHR. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2010; **322**(1-2):135-43.

- **Brand OJ, Barrett JC, Simmonds MJ, Newby PR, McCabe CJ, Bruce CK, Kysela B, Carr-Smith JD, Brix T, Hunt PJ, Wiersinga WM, Hegedüs L, Connell J, Wass JA, Franklyn JA, Weetman AP, Heward JM und Gough SC:** Association of the thyroid stimulating hormone receptor gene (TSHR) with Graves' disease. *Human Molecular Genetics*. 2009; **18**(9):1704-1713.
- **Brix TH, Kyvik KO, Christensen K und Hegedüs L:** Evidence for a major role of heredity in Graves' disease: a population-based study of two Danish twin cohorts. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2001; **86**(2):930-934.
- **Brochmann H, Bjøro T, Gaarder PI, Hanson F und Frey HM:** Prevalence of thyroid dysfunction in elderly subjects. A randomized study in a Norwegian rural community (Naerøy). *Acta Endocrinologica (Copenhagen)*. 1988; **117**(1):7-12.
- **Cederblad B, Gobl AE und Alm GV:** The induction of interferon-alpha and interferon-beta mRNA in human natural interferon-producing blood leukocytes requires de novo protein synthesis. *Journal of Interferon Research*. 1991; **11**(6):371-377.
- **Chaplin DD:** Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010; **125**:3-23.
- **Chen QY, Huang W, She JX, Baxter F, Volpe R und Maclaren NK:** HLA-DRB1*08, DRB1*03/DRB3*0101, and DRB3*0202 are susceptibility genes for Graves' disease in North American Caucasians, whereas DRB1*07 is protective. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1999; **84**(9):3182-3186.

- **Chevrel G, Calvet A, Belin V und Miossec P:** Dermatomyositis associated with the presence of parvovirus B19 DNA in muscle. *Rheumatology*. 2000; **39(9):1037-1039**.

- **Christakos S, Raval-Pandya M, Wernyj RP und Yang W:** Genomic mechanisms involved in the pleiotropic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Biochemical Journal*. 1996; **316(Pt 2):361-371**.

- **Christen U, Benke D, Wolfe T, Rodrigo E, Rhode A, Hughes AC, Oldstone MB und von Herrath MG:** Cure of prediabetic mice by viral infections involves lymphocyte recruitment along an IP-10 gradient. *Journal of Clinical Investigation*. 2004; **113(1):74-84**.

- **Classen M, Diehl V, Kochsiek K:** Innere Medizin. 5.Auflage, Urban und Fischer, München. 2004; S. 2224.

- **Classen M, Diehl V, Kochsieck K:** Innere Medizin. 6. Auflage, Urban und Fischer bei Elsevier, München. 2009; S.1093, S.1102-1111, S.1115.

- **Collins JE, Heward JM, Carr-Smith J, Daykin J, Franklyn JA und Gough SC:** Association of a rare thyroglobulin gene microsatellite variant with autoimmune thyroid disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2003; **88(10):5039-5042**.

- **Criswell LA, Pfeiffer KA, Lum RF, Gonzales B, Novitzke J, Kern M, Moser KL, Begovich AB, Carlton VE, Li W, Lee AT, Ortmann W, Behrens TW und Gregersen PK:** Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes. *American Journal of Human Genetics*. 2005; **76(4):561-571**.

- **Dechairo BM, Zabaneh D, Collins J, Brand O, Dawson GJ, Green AP, Mackay I, Franklyn JA, Connell JM, Wass JA, Wiersinga WM,**

- Hegedus L, Brix T, Robinson BG, Hunt PJ, Weetman AP, Carey AH und Gough SC:** Association of the TSHR gene with Graves' disease: the first disease specific locus. *European Journal of Human Genetics*. 2005; **13**(11):1223-1230.
- **Desailloud R und Hober D:** Viruses and thyroiditis: an update. *Virology Journal*. 2009; **6**:5.
- **Dietel M, Dudenhausen J und Suttorp N:** Harrisons Innere Medizin. 2. deutsche Ausgabe der 15. Auflage, ABW Wissenschaftsverlag in Zusammenarbeit der Charité – Berlin, Leiben. 2003; S. 2255-2303 und S. 2307-2338.
- **Dittmar M, Kaczmarczyk A, Bischofs C und Kahaly GJ:** The proinflammatory cytokine TNF-alpha -308 AA genotype is associated with polyglandular autoimmunity. *Immunological investigations*. 2009; **38**(3-4):255-267.
- **Doerr HW und Gerlich WH:** Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheiten. 2. Auflage, Thieme, Stuttgart-New York. 2010; S.49 und S.55.
- **Donner H, Braun J, Seidl C, Rau H, Finke R, Ventz M, Walfish PG, Usadel KH und Badenhoop K:** Codon 17 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene in Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997; **82**(12):4130-4132.
- **Donner H, Rau H, Walfish PG, Braun J, Siegmund T, Finke R, Herwig J, Usadel KH und Badenhoop K:** CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997; **82**(1):143-146.

- **Doria A, Canova M, Tonon M, Zen M, Rampudda E, Bassi N, Atzeni F, Zampieri S und Ghirardello A:** Infections as triggers and complications of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews*. 2008; **8**(1):24-28.

- **Elenkov IJ und Chrousos GP:** Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002; **966**:290-303.

- **Ercolini AM und Miller SD:** The role of infections in autoimmune disease. *Clinical and Experimental Immunology*. 2009; **155**(1):1-15.

- **Erichsen MM, Løvås K, Skinningsrud B, Wolff AB, Undlien DE, Svartberg J, Fougner KJ, Berg TJ, Bollerslev J, Mella B, Carlson JA, Erlich H und Husebye ES:** Clinical, immunological, and genetic features of autoimmune primary adrenal insufficiency: observations from a Norwegian registry. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2009; **94**(12):4882-4890.

- **Falorni A, Laureti S und Santeusanio F:** Autoantibodies in autoimmune polyendocrine syndrome type II. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2002; **31**(2):369-389.

- **Falorni A, Laureti S, De Bellis A, Zanchetta R, Tiberti C, Arnaldi G, Bini V, Beck-Peccoz P, Bizzarro A, Dotta F, Mantero F, Bellastella A, Betterle C, Santeusanio F: SIE Addison Study Group:** Italian Addison network study: update of diagnostic criteria for the etiological classification of primary adrenal insufficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2004; **89**(4):1598-1604.

- **Farrokhyar F, Swarbrick ET, und Irvine EJ:** A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. *Scandinavian*

- Journal of Gastroenterology*. 2001; **36**(1):2-15. Erratum in: *Scand J Gastroenterol* 2001; **36**(6):561.
- **Feldkamp J**: Autoimmune thyroiditis: diagnosis and treatment. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 2009; **134**(49):2504-2509.
 - **Feldman SB, Ferraro M, Zheng HM, Patel N, Gould-Fogerite S und Fitzgerald-Bocarsly P**: Viral induction of low frequency interferon-alpha producing cells. *Virology*. 1994; **204**(1):1-7.
 - **Fenzi GF, Giani C, Ceccarelli P, Bartalena L, Macchia E, Aghini-Lombardi F, Vitti P, Lari R, Ceccarelli C und Baschieri L**: Role of autoimmune and familial factors in goiter prevalence. Studies performed in a moderately endemic area. *Journal of Endocrinological Investigation*. 1986; **9**(2):161-164.
 - **Filippi CM, Estes EA, Oldham JE und von Herrath MG**: Immunoregulatory mechanisms triggered by viral infections protect from type 1 diabetes in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2009; **119**(6):1515-1523.
 - **Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM und Maniatis T**: IKKe and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nature Immunology*. 2003; **4**(5):491–496.
 - **Freeman M und Weetman AP**: T and B cell reactivity to adrenal antigens in autoimmune Addison's disease. *Clinical and Experimental Immunology*. 1992; **88**(2):275-279.
 - **Friedrich N, Schwarz S, Thonack J, John U, Wallaschofski H und Völzke H**: Association between parity and autoimmune thyroiditis in a general female population. *Autoimmunity*. 2008; **41**(2):174-180.

- **Gershwin ME:** The mosaic of autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. 2008; **7(3):161-163.**
- **Ghoreschi K und Röcken M:** Molecular and cellular basis for designing gene vaccines against inflammatory autoimmune disease. *Trends in Molecular Medicine*. 2003; **9(8):331-338.**
- **Gough SC, Walker LS und Sansom DM:** CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunological Reviews* 2005; **204:102-115.**
- **Hashimoto H:** Zur Kenntnis der lymphomatösen Veränderung der Schilddrüse (Struma lymphomatosa). *Langenbecks Archiv für klinische Chirurgie*. 1912; **97:219.**
- **Hawkins BR, Cheah PS, Dawkins RL, Whittingham S, Burger HG, Patel Y, Mackay IR und Welborn TA:** Diagnostic significance of thyroid microsomal antibodies in randomly selected population. *Lancet*. 1980; **2(8203):1057-1059.**
- **Helling RB, Goodman HM, Boyer HW:** Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *Journal of Virology*. 1974; **14(5):1235-1244.**
- **Herrath M:** Diabetes: A virus-gene collaboration. *Nature*. 2009; **459(7246):518-519.**
- **Heward J und Gough SC:** Genetic susceptibility to the development of autoimmune disease. *Clinical Science*. 1997; **93(6):479-491.**
- **Hiratani H, Bowden DW, Ikegami S, Shirasawa S, Shimizu A, Iwatani Y und Akamizu T:** Multiple SNPs in intron 7 of thyrotropin receptor are

- associated with Graves' disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005; **90**(5):2898-2903.
- **Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA und Braverman LE:** Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; **87**(2):489-499.
 - **Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzózka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S und Hartmann G:** 5-triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*. 2006; **314**(5801):994-997.
 - **Huber A, Menconi F, Corathers S, Jacobson EM, Tomer Y:** Joint genetic susceptibility to type I diabetes and autoimmune thyroiditis: from epidemiology to mechanisms. *Endocrine Reviews* 2008, **29**:697-725.
 - **Hyppönen E, Läärä E, Reunanen A, Järvelin MR, Virtanen SM:** Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet*. 2001; **358**(9292):1500-1503.
 - **Jacobson EM und Tomer Y:** The CD40, CTLA-4, thyroglobulin, TSH receptor, and PTPN22 gene quintet and its contribution to thyroid autoimmunity: back to the future. *Journal of Autoimmunity*. 2007a; **28**(2-3):85-98.
 - **Jacobson EM und Tomer Y:** The genetic basis of thyroid autoimmunity. *Thyroid*. 2007b; **17**(10):949-961.

- **Janeway CA, Murphy KM, Travers P und Walport M:** Immunologie. 7.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 2009; S.19, S.43, S.108, S.328, S.438-440, S. 754-769 und S.791.

- **Jermendy A, Szatmári I, Laine AP, Lukács K, Horváth KH, Körner A, Madácsy L, Simell O, Knip M, Ilonen J, Hermann R:** The interferon-induced helicase IFIH1 Ala946Thr polymorphism is associated with type 1 diabetes in both the high-incidence Finnish and the medium-incidence Hungarian populations. *Diabetologia*. 2010; **53**:98-102.

- **Kadowaki N, Antonenko S und Liu YJ:** Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN. *The Journal of Immunology*. 2001; **166**(4):2291-2295.

- **Kahaly GJ:** Polyglandular autoimmune syndromes. *European Journal of Endocrinology*. 2009; **161**(1):11-20.

- **Kahles H, Ramos-Lopez E, Lange B, Zwermann O, Reincke M und Badenhoop K:** Sex-specific association of PTPN22 1858T with type 1 diabetes but not with Hashimoto's thyroiditis or Addison's disease in the German population. *European Journal of Endocrinology*. 2005; **153**(6):895-899.

- **Kallenberg CG und Tadema H:** Vasculitis and infections: contribution to the issue of autoimmunity reviews devoted to "autoimmunity and infection". *Autoimmunity Reviews*. 2008; **8**(1):29-32.

- **Kanno T, Kim K, Kono K, Drescher KM, Chapman NM und Tracy S:** Group B coxsackievirus diabetogenic phenotype correlates with

- replication efficiency. *Journal of Virology*. 2006; **80**(11): 5637-5643.
Erratum in: Journal of Virology. 2006; **80**(17):8843.
- **Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, Hiiragi A, Dermody TS, Fujita T und Akira S:** Lengthdependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *Journal of Experimental Medicine*. 2008; **205**(7):1601-1610.
 - **Kawai H, Mitsui T, Yokoi K, Akaike M, Hirose K, Hizawa K und Saito S:** Evidence of HTLV-I in thyroid tissue in an HTLV-I carrier with Hashimoto's thyroiditis. *Journal of Molecular Medicine*. 1996; **74**(5):275-278.
 - **Kawai T und Akira S:** The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology*. 2009; **21**(4): 317-37.
 - **Kawai T und Akira S:** Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008; **1143**:1-20.
 - **Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O und Akira S:** IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nature Immunology*. 2005; **6**(10):981–988.
 - **Kemp EH, Ajjan RA, Husebye ES, Peterson P, Uibo R, Imrie H, Pearce SH, Watson PF und Weetman AP:** A cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphism is associated with autoimmune Addison's disease in English patients. *Clinical Endocrinology*. 1998; **49**(5):609-613.
 - **Kim MS und Polychronakos C:** Immunogenetics of type 1 diabetes. *Hormone Research*. 2005; **64**(4):180-188.

- **Knip M, Veijola R, Virtanen SM, Hyöty H, Vaarala O und Akerblom HK:** Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005; **54**(Suppl 2):125-136.

- **Komuro A und Horvath CM:** RNA- and virusindependent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2. *Journal of Virology*. 2006; **80**(24):12332–12342.

- **Krassas GE, Tziomalos K, Pontikides N, Lewy H und Laron Z:** Seasonality of month of birth of patients with Graves' and Hashimoto's diseases differ from that in the general population. *European Journal of Endocrinology*. 2007; **156**(6):631-636.

- **Krug A:** Nucleic acid recognition receptors in autoimmunity. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2008; **183**:129-151.

- **Kurylowicz A, Kula D, Ploski R, Skorka A, Jurecka-Lubieniecka B, Zebracka J, Steinhof-Radwanska K, Hasse-Lazar K, Hiromatsu Y, Jarzab B und Bednarczuk T:** Association of CD40 gene polymorphism (C-1T) with susceptibility and phenotype of Graves' disease. *Thyroid*. 2005; **15**(10):1119-1124.

- **Lévy-Marchal C, Patterson C und Green A:** Variation by age group and seasonality at diagnosis of childhood IDDM in Europe. The EURODIAB ACE Study Group. *Diabetologia* 1995; **38**(7):823–830.

- **Li X, Ranjith-Kumar CT, Brooks MT, Dharmaiah S, Herr AB, Kao C und Li P:** The RIG-I-like receptor LGP2 recognizes the termini of double-stranded RNA. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; **284**(20):13881–13891.

- **Liblau RS, Singer SM und McDevitt HO:** Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunology Today*. 1995; **16**(1):34-38.

- **Lindemann J, Burke DC und Isaacs A:** Studies on the production, mode of action and properties of interferon. *British Journal of Experimental Pathology*. 1957; **38**(5):551-562.

- **Liu S, Wang H, Jin Y, Podolsky R, Reddy MV, Pedersen J, Bode B, Reed J, Steed D, Anderson S, Yang P, Muir A, Steed L, Hopkins D, Huang Y, Purohit S, Wang CY, Steck AK, Montemari A, Eisenbarth G, Rewers M und She JX:** IFIH1 polymorphisms are significantly associated with type 1 diabetes and IFIH1 gene expression in peripheral blood mononuclear cells. *Human Molecular Genetics*. 2009; **18**(2):358-365.

- **Löffler G und Petrides PE:** Biochemie und Pathobiochemie. 7. Auflage, Springer Verlag GmbH, Heidelberg. 2002; S.258.

- **Lönnrot M, Korpela K, Knip M, Ilonen J, Simell O, Korhonen S, Savola K, Muona P, Simell T, Koskela P und Hyöty H:** Enterovirus infection as a risk factor for beta-cell autoimmunity in a prospectively observed birth cohort: the Finnish Diabetes Prediction and Prevention Study. *Diabetes*. 2000; **49**(8):1314-1318.

- **Maeger A:** The interferons: characterization and application. Wiley-VCH-Verlag, Weinheim. 2006; S.143 und S.4.

- **Malathi K, Dong B, Gale M Jr und Silverman RH:** Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature*. 2007; **448**(7155):816-819.

- **Männistö T, Vääräsmäki M, Pouta A, Hartikainen AL, Ruokonen A, Surcel HM, Bloigu A, Järvelin MR und Suvanto-Luukkonen E:** Perinatal outcome of children born to mothers with thyroid dysfunction or antibodies: a prospective population-based cohort study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009; **94**(3):772-779.

- **Martínez A, Santiago JL, Cénit MC, de Las Heras V, de la Calle H, Fernández-Arquero M, Arroyo R, de la Concha EG und Urcelay E:** IFIH1-GCA-KCNH7 locus: influence on multiple sclerosis risk. *European Journal of Human Genetics*.2008a; **16**(7):861-864.

- **Martínez A, Varadé J, Lamas JR, Fernández-Arquero M, Jover JA, de la Concha EG, Fernández-Gutiérrez B und Urcelay E:** Association of the IFIH1-GCA-KCNH7 chromosomal region with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008b; **67**(1):137-138.

- **Matos-Santos A, Nobre EL, Costa JG, Nogueira PJ, Macedo A, Galvão-Teles A und de Castro JJ:** Relationship between the number and impact of stressful life events and the onset of Graves' disease and toxic nodular goitre. *Clinical Endocrinology*. 2001; **55**(1):15-19.

- **McGrogan A, Seaman HE, Wright JW und de Vries CS:** The incidence of autoimmune thyroid disease: a systematic review of the literature. *Clinical Endocrinology*. 2008; **69**(5):687-696.

- **Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R und Tschopp J:** Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*. 2005; **437**(7062):1167–1172.

- **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF:** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988, **16**:1215.

- **Misaki T, Iida Y, Kasagi K und Konishi J:** Seasonal variation in relapse rate of graves' disease after thionamide drug treatment. *Endocrine Journal*. 2003; **50**(6): 669-672.

- **Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK und Schäfer-Korting M:** Arzneimittelwirkungen. 8. Auflage, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart*. 2001; S.925.

- **Myhre AG, Undlien DE, Løvås K, Uhving S, Nedrebø BG, Fougner KJ, Trovik T, Sørheim JI und Husebye ES:** Autoimmune adrenocortical failure in Norway autoantibodies and human leukocyte antigen class II associations related to clinical features. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; **87**(2):618-623.

- **Nawroth PP und Ziegler R:** Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel. 1. Auflage, *Springer, Berlin*. 2001; S.58-68, S.124-130.

- **Nielsen C, Hansen D, Husby S und Lillevang ST:** Sex-specific association of the human PTPN22 1858T-allele with type 1 diabetes. *International Journal of Immunogenetics*. 2007; **34**(6):469-473.

- **Nisticò L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C, Bosi E, Larrad MT, Rios MS, Chow CC, Cockram CS, Jacobs K, Mijovic C, Bain SC, Barnett AH, Vandewalle CL, Schuit F, Gorus FK, Tosi R, Pozzilli P und Todd JA:** The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Human Molecular Genetics*. 1996; **5**(7):1075-1080.

- **Nithiyananthan R, Heward JM, Allahabadia A, Franklyn JA und Gough SC:** Polymorphism of the CTLA-4 gene is associated with autoimmune hypothyroidism in the United Kingdom. *Thyroid*. 2002; **12(1):3-6**.

- **Okamura K, Nakashima T, Ueda K, Inoue K, Omae T, und Fujishima M:** Thyroid disorders in the general population of Hisayama Japan, with special reference to prevalence and sex differences. *International Journal of Epidemiology*. 1987; **16(4):545-549**.

- **Paschke R, Bertelsbeck DS, Tsalimalma K und Nieschlag E:** Association of sperm antibodies with other autoantibodies in infertile men. *American Journal of Reproductive Immunology*. 1994; **32(2):88-94**.

- **Pearce EN, Farwell AP und Braverman LE:** Thyroiditis. *The New England Journal of Medicine*. 2003; **348(26):2646-2655**. Erratum in: *The New England Journal of Medicine*. 2003; **349(6):620**.

- **Pearce SH, Vaidya B, Imrie H, Perros P, Kelly WF, Toft AD, McCarthy MI, Young ET und Kendall-Taylor P:** Further evidence for a susceptibility locus on chromosome 20q13.11 in families with dominant transmission of Graves disease. *American Journal of Human Genetics*. 1999; **65(5):1462-1465**.

- **Pedersen IB, Knudsen N, Jørgensen T, Perrild H, Ovesen L und Laurberg P:** Thyroid peroxidase and thyroglobulin autoantibodies in a large survey of populations with mild and moderate iodine deficiency. *Clinical Endocrinology*. 2003; **58(1):36-42**.

- **Phenekos C, Vryonidou A, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Goula M und Papamichail M:** Th1 and Th2 serum cytokine profiles characterize

- patients with Hashimoto's thyroiditis (Th1) and Graves' disease (Th2). *Neuroimmunomodulation*. 2004; **11**(4):209-123.
- **Pippig DA, Hellmuth JC, Cui S, Kirchhofer A, Lammens K, Lammens A, Schmidt A, Rothenfusser S und Hopfner KP:** The regulatory domain of the RIG-I family ATPase LGP2 senses double-stranded RNA. *Nucleic Acids Research*. 2009; **37**(6):2014–2025.
 - **Pop VJ, de Vries E, van Baar AL, Waelkens JJ, de Rooy HA, Horsten M, Donkers MM, Komproe IH, van Son MM und Vader HL:** Maternal thyroid peroxidase antibodies during pregnancy: a marker of impaired child development? *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1995; **80**(12):3561-3566.
 - **Prentice LM, Phillips DI, Sarsero D, Beever K, McLachlan SM und Smith BR:** Geographical distribution of subclinical autoimmune thyroid disease in Britain: a study using highly sensitive direct assays for autoantibodies to thyroglobulin and thyroid peroxidase. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)*. 1990 ; **123**(5):493-498.
 - **Prummel MF und Wiersinga WM:** Smoking and risk of Graves' disease. *The Journal of the American Medical Association*. 1993; **269**(4): 479-482.
 - **Prummel MF und Wiersinga WM:** Thyroid peroxidase autoantibodies in euthyroid subjects. Best Practice & Research. *Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005; **19**(1):1-15.
 - **Prummel MF, Strieder T und Wiersinga WM:** The environment and autoimmune thyroid diseases. *European Journal of Endocrinology*. 2004; **150**(5):605-618.

- **Pugliatti M, Sotgiu S, Solinas G, Castiglia P, Pirastru MI, Murgia B, Mannu L, Sanna G und Rosati G:** Multiple sclerosis epidemiology in Sardinia: evidence for a true increasing risk. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2001; **103**(1):20-26.

- **Qu HQ, Marchand L, Grabs R und Polychronakos C:** The association between the IFIH1 locus and type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2008; **51**(3):473-475.

- **Raha O, Chowdhury S, Dasgupta S, Raychaudhuri P, Sarkar BN, Raju PV und Rao VR:** Approaches in type 1 diabetes research: A status report. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*. 2009; **29**(2):85-101.

- **Ramos-Lopez E, Fernandez-Balsells M, Kahles H, Seidl C, Ferrer J und Badenhoop K:** HLA-DQ haplotypes in Spanish and German families with Graves' disease: contribution to DQA1*0501-DQB1*0301 mediated genetic susceptibility from fathers. *Thyroid*. 2007; **17**(11):1131-1135.

- **Randone SB, Guiducci S und Cerinic MM:** Systemic sclerosis and infections. *Autoimmunity Reviews*. 2008; **8**(1):36-40.

- **Rapoport B, Chazenbalk GD, Jaume JC und McLachlan SM:** The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies. *Endocrine Reviews*. 1998; **19**(6):673-716.

- **Rink T, Schroth H-J, Holle L-H und Garth H:** Effekte von Iodid und Schilddrüsenhormonen bei der Induktion und Therapie einer Thyreoiditis Hashimoto. *Nuklearmedizin* 1999; **39**:144–149.

- **Ross TK, Darwish HM und DeLuca HF:** Molecular biology of vitamin D action. *Vitamines and Hormones*. 1994; **49**:281-326.

- **Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, Yamamoto M, Akira S und Fitzgerald KA:** The RNA helicase Lgp inhibits TLR- independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *The Journal of Immunology*. 2005; **175**(8):5260-5268.

- **Saccucci P, Del Duca E, Rapini N, Verrotti A, Piccinini S, Maccari A, Canu G, Angelini F, Fontana L, Giannini C, Chiarelli F, Manca Bitti ML und Bottini N:** Association between PTPN22 C1858T and type 1 diabetes: a replication in continental Italy. *Tissue Antigens*. 2008; **71**(3):234-237.

- **Saito T, Hirai R, Loo YM, Owen D, Johnson CL, Sinha SC, Akira S, Fujita T und Gale M Jr:** Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;**104**(2):582–587.

- **Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Iaccarino L und Doria A:** Environment and systemic lupus erythematosus: an overview. *Autoimmunity*. 2005; **38**(7):465-472.

- **Schütt C und Bröker B:** Grundwissen Immunologie. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 2009; S.103-106.

- **Seissler J, Schott M, Steinbrenner H, Peterson P und Scherbaum WA:** Autoantibodies to adrenal cytochrome P450 antigens in isolated Addison's disease and autoimmune polyendocrine syndrome type II.

- Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 1999; **107**(3):208-213.
- **Seth RB, Sun L, Ea CK und Chen ZJ**: Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- κ B and IRF 3. *Cell*. 2005; **122**(5):669–682.
 - **Sfriso P, Ghirardello A, Botsios C, Tonon M, Zen M, Bassi N, Bassetto F und Doria A**: Infections and autoimmunity: the multifaceted relationship. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010; **87**(3):385-395.
 - **Shigemoto T, Kageyama M, Hirai R, Zheng J, Yoneyama M und Fujita T**: Identification of loss of function mutations in human genes encoding RIG-I and MDA5: implications for resistance to type I diabetes. *Journal of Biological Chemistry*.. 2009; **284**(20):13348-13354.
 - **Siegal FP , Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S und Liu YJ**: The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*. 1999; **284**(5421):1835-1837.
 - **Siminovitch KA**: PTPN22 and autoimmune disease. *Nature Genetics*. 2004; **36**(12):1248-1249.
 - **Skinningsrud B, Husebye ES, Gervin K, Løvås K, Blomhoff A, Wolff AB, Kemp EH, Egeland T und Undlien DE**: Mutation screening of PTPN22: association of the 1858T-allele with Addison's disease. *European Journal of Human Genetics*. 2008; **16**(8):977-982.
 - **Smyth DJ, Cooper JD, Collins JE, Heward JM, Franklyn JA, Howson JM, Vella A, Nutland S, Rance HE, Maier L, Barratt BJ, Guja C, Ionescu-Tîrgoviste C, Savage DA, Dunger DB, Widmer B, Strachan**

- DP, Ring SM, Walker N, Clayton DG, Twells RC, Gough SC und Todd JA:** Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes*. 2004; **53**(11):3020-3023.
- **Smyth DJ, Cooper JD, Bailey R, Field S, Burren O, Smink LJ, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Widmer B, Dunger DB, Savage DA, Walker NM, Clayton DG und Todd JA:** A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nature Genetics*. 2006; **38**(6):617-619.
- **Sternberg EM:** Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. *Journal of Endocrinology*. 2001; **169**(3):429-435.
- **Stetson DB und Medzhitov R:** Type I Interferons in host defense. *Immunity*. 2006; **25**(3):373–381.
- **Strieder TG, Prummel MF, Tijssen JG, Endert E und Wiersinga WM:** Risk factors for and prevalence of thyroid disorders in a cross-sectional study among healthy female relatives of patients with autoimmune thyroid disease. *Clinical Endocrinology*. 2003; **59**(3):396-401.
- **Sutherland A, Davies J, Owen CJ, Vaikkakara S, Walker C, Cheetham TD, James RA, Perros P, Donaldson PT, Cordell HJ, Quinton R und Pearce SH:** Genomic polymorphism at the interferon-induced helicase (IFIH1) locus contributes to Graves' disease susceptibility. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007; **92**(8):3338-3341.
- **Tait KF und Gough SC:** The genetics of autoimmune endocrine disease. *Clinical Endocrinology*. 2003; **59**(1):1-11.

- **Takahasi K, Kumeta H, Tsuduki N, Narita R, Shigemoto T, Hirai R, Yoneyama M, Horiuchi M, Ogura K, Fujita T und Inagaki F:** Solution structures of cytosolic RNA sensor MDA5 and LGP2 C-terminal domains: identification of the RNA recognition loop in RIG-I-like receptors. *Journal of Biological Chemistry.* 2009; **284**(26):17465–17474.

- **Tandon N, Zhang L und Weetman AP:** HLA associations with Hashimoto's thyroiditis. *Clinical Endocrinology.* 1991; **34**(5):383-386. *Erratum in: Clinical Endocrinology.* 1994; **40**(5):702.

- **Tomer Y und Menconi F:** Interferon induced thyroiditis. Best Practice & Research. *Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2009; **23**(6):703-712.

- **Tomer Y, Barbesino G, Greenberg DA, Concepcion E und Davies TF:** A new Graves disease-susceptibility locus maps to chromosome 20q11.2. International Consortium for the Genetics of Autoimmune Thyroid Disease. *American Journal of Human Genetics.* 1998; **63**(6):1749-1756.

- **Tomer Y, Concepcion E und Greenberg DA:** A C/T single-nucleotide polymorphism in the region of the CD40 gene is associated with Graves' disease. *Thyroid.* 2002; **12**(12):1129-1135.

- **Tunbridge WM, Evered DC, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F, Evans JG, Young E, Bird T und Smith PA:** The spectrum of thyroid disease in a community: the Wickham survey. *Clinical Endocrinology.* 1977; **7**(6):481-493.

- **Tuomilehto J, Karvonen M, Pitkaniemi J, Virtala E, Kohtamäki K, Toivanen L und Tuomilehto-Wolf E:** Record-high incidence of Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus in Finnish children. The Finnish

- Childhood Type 1 Diabetes Registry Group. *Diabetologia*. 1999; 42(6):655-660.
- **Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KM, Smith AN, Di Genova G, Herr MH, Dahlman I, Payne F, Smyth D, Lowe C, Twells RC, Howlett S, Healy B, Nutland S, Rance HE, Everett V, Smink LJ, Lam AC, Cordell HJ, Walker NM, Bordin C, Hulme J, Motzo C, Cucca F, Hess JF, Metzker ML, Rogers J, Gregory S, Allahabadia A, Nithiyananthan R, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Bingley P, Gillespie KM, Undlien DE, Rønningen KS, Guja C, Ionescu-Tîrgoviște C, Savage DA, Maxwell AP, Carson DJ, Patterson CC, Franklyn JA, Clayton DG, Peterson LB, Wicker LS, Todd JA und Gough SC:** Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 2003; 423(6939):506-511.
 - **Vaidya B, Oakes EJ, Imrie H, Dickinson AJ, Perros P, Kendall-Taylor P und Pearce SH:** CTLA4 gene and Graves' disease: association of Graves' disease with the CTLA4 exon 1 and intron 1 polymorphisms, but not with the promoter polymorphism. *Clinical Endocrinology*. 2003; 58(6):732-735.
 - **Van Boxel-Dezaire AH, Rani MR und Stark GR:** Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity*. 2006; 25(3):361–372.
 - **Van der Werf N, Kroese FG, Rozing J und Hillebrands JL:** Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2007; 23(3):169-183.
 - **Velaga MR, Wilson V, Jennings CE, Owen CJ, Herington S, Donaldson PT, Ball SG, James RA, Quinton R, Perros P und Pearce**

- SH:** The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004; **89**(11):5862-5865.
- **Vrbikova J, Janatkova I, Zamrazil V, Tomiska F und Fucikova T:** Epstein-Barr virus serology in patients with autoimmune thyroiditis. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology and German Diabetes Association.* 1996; **104**(1):89-92.
- **Weetman AP und McGregor AM:** Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocrine Reviews.* 1994; **15**(6):788-830.
- **Wilkins C und Gale M Jr:** Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. *Current Opinion in Immunology.* 2010; **22**(1):41-47.
- **Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z und Shu HB:** VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Molecular Cell.* 2005; **19**(6):727–740.
- **Yanagawa T, Hidaka Y, Guimaraes V, Soliman M und DeGroot LJ:** CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1995; **80**(1):41-45.
- **Yoneyama M und Fujita T:** RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunological Reviews* 2009; **227**(1):54–65.
- **Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M Jr, Akira S, Yonehara S, Kato A und Fujita T:** Shared and unique functions of the DExD / H-box helicases

- RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *The Journal of Immunology* 2005; **175**(5): 2851–2858.
- **Yousef GE, Isenberg DA und Mowbray JF:** Detection of enterovirus specific RNA sequences in muscle biopsy specimens from patients with adult onset myositis. *Annals of the rheumatic diseases*. 1990; **49**(5):310-315.

 - **Zampieri S, Ghirardello A, Iaccarino L, Briani C, Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Arienti S, Todesco S und Doria A:** Polymyositis-dermatomyositis and infections. *Autoimmunity*. 2006; **39**(3):191-196.

 - **Zhao ZF, Cui B, Chen HY, Wang S, Li I, Gu XJ, Qi L, Li XY, Ning G und Zhao YJ:** The A946T polymorphism in the interferon induced helicase gene does not confer susceptibility to Graves' disease in Chinese population. *Endocrine*. 2007; **32**(2):143-147.

6 Anhang

6.1 Danksagung

An erster Stelle richtet sich mein Dank an meinen Doktorvater Prof. Dr. Klaus Badenhoop für die Überlassung des Themas, die inhaltliche und fachliche Beratung und für die Bereitstellung der Laborräume, der Geräte und Materialien.

Meiner Betreuerin Frau Dr. phil. M. Penna-Martinez danke ich für die methodische und inhaltliche Unterstützung im Labor, für ihre Beratung bei den vielen aufkommenden Fragen. Frau Dr. med. M.E. Ramos-Lopez möchte ich vor allem für ihre Hilfe bei der Konzeption der Dissertation danken. Meinen Mitdoktorandinnen, Frau Dilek Sadet und Frau Karolina Swiech danke ich für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern. Sie haben den geistigen und zeitlichen Freiraum geschaffen, ohne den diese Arbeit nicht zu Stande gekommen wäre.

Danke!

6.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Inka Elisabeth Robbers
Geburtsdatum 06. September 1982
Geburtsort Freiburg im Breisgau
Eltern Annette Maria Daniels-Robbers, geb. Daniels
Prof. Dr. iur. Gerhard Robbers

Ausbildung

1989-1990 Grundschule Sölden
1990-1993 Grundschule Trier-Ruwer
1993-1999 Friedrich-Wilhelm-Gymnasium Trier
1999-2000 Miamisburg High School (Ohio, USA),
Abschluss mit dem ‚Certificate of Attendance‘ für
Austauschschüler im Mai 2000
2000-2002 Friedrich-Wilhelm-Gymnasium Trier, Abschluss mit der
Allgemeinen Hochschulreife im März 2002
(Durchschnittsnote: 1,6)
2002-2009 Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang
Goethe-Universität Frankfurt am Main,
Abschluss mit dem Staatsexamen (Gesamtnote „gut“)
2007 Aufnahme in das Stipendienprogramm der Studienstiftung
des deutschen Volkes
11/2009 Ärztliche Approbation

Berufliche Tätigkeit

seit 1/2011 Assistenzärztin in Weiterbildung zur Fachärztin für
Innere Medizin und Allgemeinmedizin im Krankenhaus
Martha-Maria in München

München, den 16.07.2011

6.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Genvarianten der Immunregulation
bei den Autoimmunopathien Hashimoto-Thyreoditis,
Morbus Basedow und Morbus Addison“

im Zentrum der Inneren Medizin I, Gastroenterologie und Hepatologie, Pneumologie und Allergologie, Endokrinologie und Diabetologie sowie Ernährungsmedizin unter Betreuung und Anleitung von Herrn Prof. Dr. K. Badenhoop mit der Unterstützung durch Frau Dr. phil. nat. M. Penna-Martinez und Frau Dr. med. M. E. Ramos-Lopez ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Penna-Martinez M, Ramos-Lopez E, Robbers I, Kahles H, Hahner S, Willenberg H, Reisch N, Seidl C, Segni M, Badenhoop K.

BMC Medical Genetetics 2009 (10) :126.

München den 16.07.2011
