

**Aus dem Zentrum der Inneren Medizin
Medizinische Klinik I
Schwerpunkt Endokrinologie und Stoffwechsel
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. Klaus Badenhoop**

**Apoptose und Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen:
Genetische Polymorphismen in Fas, Fas Ligand und Bcl-2**

Dissertation

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

vorgelegt von

**Bettina Johanna Stuck
aus
Frankfurt am Main**

Frankfurt am Main, 2006

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referent: Prof. Dr. K. Badenhoop
Koreferent: Prof. Dr. Ch. Seidl

Datum der mündlichen Prüfung: 30. April 2007

Danksagung

Zu Beginn dieser Arbeit soll mein Dank stehen an all diejenigen, ohne die die vorliegende Arbeit in dieser Form nicht entstanden wäre.

An erster Stelle richtet sich dieser Dank an meinen Doktorvater Prof. Dr. Klaus Badenhoop für die Bereitstellung des Themas, der Laborräume, Geräte und Materialien und seine inhaltliche und fachliche Beratung. Sein spürbares Interesse am Gelingen dieser Arbeit, seine ständige Diskussionsbereitschaft und Geduld haben die Fertigstellung ermöglicht. Sein Leitwort „Fördern und Fordern“ hat er in hervorragender Weise umgesetzt, gab mir die Chance zu selbstständiger wissenschaftlicher Arbeit und die Gelegenheit, die Ergebnisse dieses Projektes in Fachzeitschriften zu publizieren sowie auf dem Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie vor einem wissenschaftlichen Publikum zu vertreten.

Meinem Betreuer Dr. Michael Pani danke ich für seine ständige Unterstützung in methodischen und inhaltlichen Belangen. Er hat mir durch die großzügige Weitergabe seines Wissens die Freude an der wissenschaftlichen Arbeit vermittelt und trug durch stete Auffrischung und Ergänzung insbesondere meiner statistischen Grundkenntnisse sowie die Korrektur von anscheinend nicht immer schönen Vorabversionen mit konstruktiven Anregungen erheblich zum Gelingen dieser Arbeit bei. Durch seine Unterstützung über das Studium und diese Arbeit hinaus wurde er nicht nur zu einem außergewöhnlichen Mentor, sondern es entstand auch eine wertvolle Freundschaft.

Meinen Eltern gilt der Dank für ihre uneingeschränkte Förderung meiner Ausbildung. Wichtiger noch als die finanzielle Unterstützung, die mir den vollen zeitlichen und geistigen Freiraum für das Entstehen dieser Arbeit geboten hat, sind ihr Vertrauen und ihre Geduld. Sie haben den unkonventionellen Lebenswandel, der mit mir und dieser Arbeit einherging, und meine doch etwas sprunghafte Zeitplanung mitgetragen.

Meiner Mutter danke ich für ihre Verlässlichkeit. Besonders in der kritischen Phase hat sie mit Einfühlungsvermögen und Rücksicht wesentlich zum Fortgang dieser Arbeit beigetragen. Von ihr habe ich den gesunden Optimismus, der mein Leben prägt und positiv beeinflusst. Meinem Vater vielen Dank für die technische Unterstützung und seine bemerkenswerte Geduld mit mir und den Tücken der elektronischen Datenverarbeitungsprogramme. Meinem Bruder für seine bewundernswerte Gelassenheit und die Unterstützung bei der Ausarbeitung des Layouts und der Drucklegung.

Viele Personen, die mich während der verschiedenen Etappen dieser Arbeit begleitet und auf ihre ganz eigene Art unterstützt haben, sind ungenannt. Auch ihnen sei an dieser Stelle gedankt.

Danke!

Meiner Mutter

1) Einleitung	1
1.1) Apoptose.....	1
1.1.1) Definition und physiologische Relevanz	1
1.1.2) Regulation der Apoptose.....	2
1.1.3) Der Fas-Signalweg: Fas, FasLigand und Bcl-2.....	4
1.2) Immunsystem und Autoimmunerkrankungen.....	6
1.2.1) Reifung und Funktion des Immunsystems.....	6
1.2.2) Autoimmunität	8
1.2.3) Klassifizierung der Autoimmunerkrankungen.....	10
1.3) Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen.....	12
1.3.1) Hashimoto Thyreoiditis: Klinik, Epidemiologie und Therapie.....	12
1.3.2) Morbus Basedow: Klinik, Epidemiologie und Therapie.....	13
1.4) Bedeutung der Apoptose in der Schilddrüsenautoimmunität.....	14
1.4.1) Bedeutung der Apoptose in der Immunpathologie	14
1.4.2) Pathomechanismus der Schilddrüsenautoimmunität.....	16
1.4.3) Pathomechanismus der Hashimoto Thyreoiditis.....	17
1.4.4) Pathomechanismus des Morbus Basedow	20
1.5) Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in der Analyse genetisch bedingter Erkrankungen.....	21
1.5.1) Bedeutung der SNPs im menschlichen Genom	21
1.5.2) Assoziationsanalysen	22
1.5.3) Genetische Risikomarker autoimmuner Schilddrüsenerkrankungen.....	22
2) Fragestellung.....	27
3) Individuen, Materialien und Methoden	28
3.1) Patienten, Familien und Kontrollen	28
3.2) Materialien.....	28
3.2.1) Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	28
3.2.2) Chemikalien	29
3.2.3) Puffer und Lösungen	31
3.2.4) Oligonukleotide.....	33
3.2.5) Enzyme.....	34

3.3)	Methoden.....	35
3.3.1)	DNA-Extraktion.....	36
3.3.2)	DNA-Konzentrationsbestimmungen.....	37
3.3.3)	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	37
3.3.4)	Mutagenically-separated PCR.....	38
3.3.5)	Reaktionsansätze der PCR.....	39
3.3.5.a)	Fas Promoter (A-670G).....	39
3.3.5.b)	Fas Exon 07.....	39
3.3.5.c)	FasL Promoter (C-843T).....	40
3.3.5.d)	FasL Intron 02 (IVS2nt-124).....	40
3.3.5.e)	FasL EBP.....	41
3.3.5.f)	Bcl-2 SNP 1955.....	41
3.3.5.g)	Einsatz der Taq-Gold® Polymerase.....	42
3.3.6)	Restriktionsfragmentlängen-Analyse.....	42
3.3.6.a)	Fas Promoter (A-670G).....	43
3.3.6.b)	Fas Exon 07.....	43
3.3.6.c)	FasL Promoter (C-843T).....	44
3.3.6.d)	FasL Intron 02 (IVS2nt-124).....	44
3.3.6.e)	FasL EBP.....	44
3.3.7)	Agarose-Gel-Elektrophorese.....	45
3.3.8)	SSCP-Analyse.....	45
3.3.9)	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE).....	46
3.4)	Statistische Auswertung.....	47
3.4.1)	Indirekte Haplotypisierung.....	47
3.4.2)	Konditionierung und Subgruppenanalyse.....	47
3.4.3)	Linkage Disequilibrium.....	48
3.4.4)	Chi ² -Vierfeldertest.....	49
3.4.5)	Transmission Disequilibrium Test (TDT).....	50
3.4.6)	Extended Transmission Disequilibrium Test (ETDT).....	50
3.4.7)	TRANSMIT-Analyse.....	51
4)	Ergebnisse	52
4.1)	Hashimoto Thyreoiditis	52
4.1.1)	Fas bei Hashimoto Thyreoiditis.....	52
4.1.1.a)	Allelverteilung und Kopplungsanalyse (Fas bei Hashimoto Thyreoiditis)....	53
4.1.1.b)	Vererbung an Patienten (Fas bei Hashimoto Thyreoiditis).....	53

4.1.1.c)	Vererbung an Geschwister (Fas bei Hashimoto Thyreoiditis).....	54
4.1.1.d)	HLA-DQA 0501 positiv (Fas bei Hashimoto Thyreoiditis).....	54
4.1.1.e)	HLA-DR3 positiv (Fas bei Hashimoto Thyreoiditis).....	55
4.1.1.f)	CTLA4-Subgruppen (Fas bei Hashimoto Thyreoiditis)	56
4.1.2)	FasL bei Hashimoto Thyreoiditis	57
4.1.2.a)	Allelverteilung und Kopplungsanalyse (FasL bei Hashimoto Thyreoiditis)..	57
4.1.2.b)	Vererbung an Patienten (FasL bei Hashimoto Thyreoiditis)	59
4.1.2.c)	Vererbung an Geschwister (FasL bei Hashimoto Thyreoiditis).....	60
4.1.2.d)	HLA-DQA 0501 positiv (FasL bei Hashimoto Thyreoiditis)	61
4.1.2.e)	HLA-DR3 positiv (FasL bei Hashimoto Thyreoiditis)	62
4.1.2.f)	CTLA4-Subgruppen (FasL bei Hashimoto Thyreoiditis)	63
4.1.3)	Bcl-2 bei Hashimoto Thyreoiditis	66
4.1.3.a)	Allelverteilung und Genotypenhäufigkeit (Bcl-2 bei Hashimoto Thyreoiditis) 66	
4.1.3.b)	Vererbung an Patienten (Bcl-2 bei Hashimoto Thyreoiditis).....	66
4.1.3.c)	Vererbung an Geschwister (Bcl-2 bei Hashimoto Thyreoiditis).....	66
4.1.3.d)	HLA-DQA 0501 positiv (Bcl-2 bei Hashimoto Thyreoiditis)	67
4.1.3.e)	HLA-DR3 positiv (Bcl-2 bei Hashimoto Thyreoiditis)	67
4.1.3.f)	CTLA4-Subgruppen (Bcl-2 bei Hashimoto Thyreoiditis)	67
4.2)	Morbus Basedow	68
4.2.1)	Fas bei Morbus Basedow	68
4.2.1.a)	Allelverteilung und Kopplungsanalyse (Fas bei Morbus Basedow).....	68
4.2.1.b)	Vererbung an Patienten (Fas bei Morbus Basedow).....	69
4.2.1.c)	Vererbung an Geschwister (Fas bei Morbus Basedow).....	69
4.2.1.d)	HLA-DQA 0501 positiv (Fas bei Morbus Basedow)	70
4.2.1.e)	HLA-DR3 positiv (Fas bei Morbus Basedow)	70
4.2.1.f)	CTLA4-Subgruppen (Fas bei Morbus Basedow)	71
4.2.2)	FasL bei Morbus Basedow	72
4.2.2.a)	Allelverteilung und Kopplungsanalyse (FasL bei Morbus Basedow).....	72
4.2.2.b)	Vererbung an Patienten (FasL bei Morbus Basedow)	74
4.2.2.c)	Vererbung an Geschwister (FasL bei Morbus Basedow).....	75
4.2.2.d)	HLA-DQA 0501 positiv (FasL bei Morbus Basedow)	75
4.2.2.e)	HLA-DR3 positiv (FasL bei Morbus Basedow)	77
4.2.2.f)	CTLA4-Subgruppen (FasL bei Morbus Basedow).....	78
4.2.3)	Bcl-2 bei Morbus Basedow	81
4.2.3.a)	Allelverteilung und Kopplungsanalyse (Bcl-2 bei Morbus Basedow).....	81
4.2.3.b)	Vererbung an Patienten (Bcl-2 bei Morbus Basedow).....	81
4.2.3.c)	Vererbung an Geschwister (Bcl-2 bei Morbus Basedow).....	81
4.2.3.d)	HLA-DQA 0501 positiv (Bcl-2 bei Morbus Basedow)	82

4.2.3.e)	HLA-DR3 positiv (Bcl-2 bei Morbus Basedow)	82
4.2.3.f)	CTLA4-Subgruppen (Bcl-2 bei Morbus Basedow)	82
5)	Diskussion.....	83
5.1)	Fas/FasL- und Bcl2-Polymorphismen bei Hashimoto Thyreoiditis	83
5.2)	Fas/FasL- und Bcl2-Polymorphismen bei Morbus Basedow	84
5.3)	Die Rolle apoptotischer Signaltransduktion in der Pathogenese der Schilddrüsenautoimmunität	85
5.4)	Ausblick.....	86
6)	Zusammenfassung	91
	Abstract	92
7)	Literatur	93
8)	Abbildungen und Tabellen	104
8.1)	Abbildungs-Verzeichnis.....	104
8.2)	Tabellen-Verzeichnis.....	104
	Tabellarischer Lebenslauf	106
	Ehrenwörtliche Erklärung	107

1) Einleitung

1.1) Apoptose

1.1.1) Definition und physiologische Relevanz

Apoptose ist eine kontrollierte, energieverbrauchende Form des Zelluntergangs, die im Gegensatz zur Nekrose durch die betroffenen Zellen selbst induziert und reguliert wird. Sie verläuft nach einem festgelegten Schema, streng kontrolliert durch externe Stimuli und zelleigene Enzyme. Das morphologische Korrelat dieses programmierten Zelltodes besteht im Schrumpfen der Zelle, der Kernkondensation und -fragmentation sowie der Organisation in Apoptose-Körperchen, die schließlich von benachbarten Zellen oder Makrophagen phagozytiert werden.¹

Im Gegensatz zur Nekrose, die unspezifisch durch Toxine, physikalische Stimuli, Ischämie oder andere Störungen der Zellhomöostase ausgelöst werden kann und in der Regel mit einer erheblich stärkeren entzündlichen Reaktion einhergeht, findet Apoptose weitgehend ohne Mitreaktion des umgebenden Gewebes statt. Da Apoptose jedoch an die Verfügbarkeit von Energie gebunden ist, findet sich in vielen Fällen – je nach der Verfügbarkeit von ATP-Reserven – ein Nebeneinander beider Todesformen, teilweise kommen auch Übergänge einer Form in die andere vor.

Seit der erstmaligen Beschreibung und der Prägung des Begriffs „Apoptose“ (Aus dem Griechischen, Bezeichnung für das Fallen der Blätter im Herbst) von Kerr et al.² im Jahr 1972 wurde daher daran gearbeitet, die beiden Arten des Zelluntergangs zu analysieren und möglichst spezifisch zu detektieren^{3,4}.

Dabei wurde die elementare physiologische Bedeutung eines regulierten Zelluntergangs deutlich. Diese besteht unter anderem in der Regulation der Embryonalentwicklung, der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase, der Reifung und Regulation des Immunsystems und entzündlicher Prozesse sowie in der Pathogenese verschiedener degenerativer, Infektions-, Tumor- und Autoimmunerkrankungen.

In der Embryonalentwicklung wird die Formung von Körperhöhlen, der Fingerzwischenräume und des Nervensystems durch Apoptose überzähliger Zellen erreicht, die vor allem aus dem Mangel einer ausreichenden Stimulation durch Wachstumsfaktoren resultiert^{5,6}. Im adulten Organismus führt die Balance zwischen Zellproliferation und -tod zur Aufrechterhaltung einer konstanten Gewebsmasse und zur Ermöglichung von Regeneration und zyklischen Wachstumsvorgängen. Die post-puerperale Involution der Brust⁷, die Abstoßung des Endometriums während der Menstruation⁸, das Absterben von Neutrophilen während einer akuten Entzündungsreaktion⁹ sind nur einige Beispiele. Außerdem werden durch Apoptose geschädigte, gealterte oder genetisch veränderte Zellen beseitigt. Auch bei der Reifung und Erneuerung des Immunsystems, insbesondere bei der Deletion autoreaktiver T-Lymphozyten im Thymus¹⁰ spielt Apoptose eine wichtige Rolle, die in 1.1.3 separat behandelt werden soll.

Eine gestörte oder übermäßige Apoptose kann auch die Entstehung oder das Fortschreiten von Krankheiten begünstigen. Bei Myokard-¹¹ und Zerebralinfarkt¹² gehen die betroffenen Areale, insbesondere die nicht direkt betroffenen Randgebiete, durch Apoptose zu Grunde; auch neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson¹³ oder Morbus Alzheimer¹⁴ sowie

periphere Neuropathien sind zu einem entscheidenden Anteil apoptose-induziert. Ebenso können Autoimmunerkrankungen auf eine fehlregulierte Apoptose zurückgeführt werden, wie unter 1.1.3 gezeigt wird.

Möglicherweise spielt eine vermehrte Expression apoptose-induzierender Faktoren auch in der Entstehung maligner Erkrankungen eine Rolle. So wurde bei diversen Neoplasien nicht nur die Expression entsprechender Regulatoren beobachtet¹⁵, sondern die Stärke der Expression korrelierte auch mit der Aggressivität und dem Metastasierungspotential verschiedener Krebsarten¹⁶. Eine der ersten malignen Erkrankungen, für die dieser Zusammenhang bewiesen werden konnte, war das B-Zell-Lymphom¹⁷. Bei diesem verursacht die Mutation eines anti-apoptotischen Proto-Onkogens, das daraufhin mit „Bcl-2“ (*B-cell-leukemia/lymphoma-2*) benannt wurde, die ungehinderte Proliferation der B-Lymphozyten.

Auch die Vorgänge im Rahmen der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wurden bereits untersucht. Hierbei scheint eine Dysregulation der physiologischen Apoptose in der Erhaltung der Gewebshomöostase und der Immunozyten der zugrunde liegende Pathomechanismus zu sein. Daher sollen zunächst die verschiedenen Regulationsmechanismen apoptotischer Prozesse betrachtet werden.

1.1.2) Regulation der Apoptose

1986 wurden von Ellis et al.¹⁸ die Gene, die die Abläufe der Apoptose in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* regulieren, charakterisiert. Aufgrund ihrer starken Homologie zu Säugetieren und auch zum Menschen wurden daraufhin eine große Anzahl von Apoptose-Regulatoren entdeckt, charakterisiert und auf ihre spezifische Beteiligung sowie mögliche pathologische Relevanz hin untersucht.

Demnach verläuft Apoptose in drei Stadien: Von der Initiation durch den externen Stimulus über die Ausführung durch intrazelluläre Proteasen bis zur Beseitigung der Zellfragmente durch Phagozyten oder benachbarte Zellen¹⁹.

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten, Apoptose spezifisch auszulösen: Durch den Entzug eines dauerhaft stimulierenden Liganden wie Wachstumsfaktoren und Zytokine oder durch die Bindung eines spezifischen apoptose-induzierenden Liganden an einen Rezeptor der Tumornekrosefaktor(TNF)-Familie.

Die Familie dieser Rezeptoren ist charakterisiert durch eine spezifische intrazelluläre Domäne, die das apoptotische Signal vermittelt und daher Todesdomäne, *death domain*, genannt wird²⁰. Die Triggerung des Rezeptors löst eine intrazelluläre Kaskade aus, die ähnlich der Blutgerinnung oder der Aktivierung des Komplementsystems über Proteolyse nachfolgender Effektorenzyme verläuft und zu sukzessiver Aktivierung verschiedener Caspasen führt.

Caspasen sind Cysteinproteasen, deren gemeinsame Merkmale in einer spezifischen Spaltung von Proteinen nach Aspartat-Resten sowie der Homologie zu den apoptose-induzierenden Genprodukten des Nematoden *C. elegans*, *Ced* (*Caenorhabditis elegans death genes*), bestehen²¹. Den einzelnen Caspasen können im Verlauf der Apoptose spezifische Aufgaben zugeordnet werden. Die Initiation der Kaskade wird durch Aktivierung von Caspase-8 oder Caspase-9 ausgelöst, die dann direkt zur Apoptose führen. Dazu werden nukleäre und zytosolische Enzyme, die für die Replikation und Reparatur der DNA sowie für RNA-Splicing oder die Aufrechterhaltung des Zytoskeletts notwendig sind, lysiert. Die Schlüsselrolle wird Caspase-3 zugeschrieben, da sie zur Formierung der apoptotischen

Körperchen, zur Kondensation des Chromatins und zur Kernfragmentation nötig ist und durch multiple Stimuli auf verschiedenen Wegen aktiviert werden kann²². Man geht davon aus, daß auf ihr verschiedene apoptotische Kaskaden konvergieren¹.

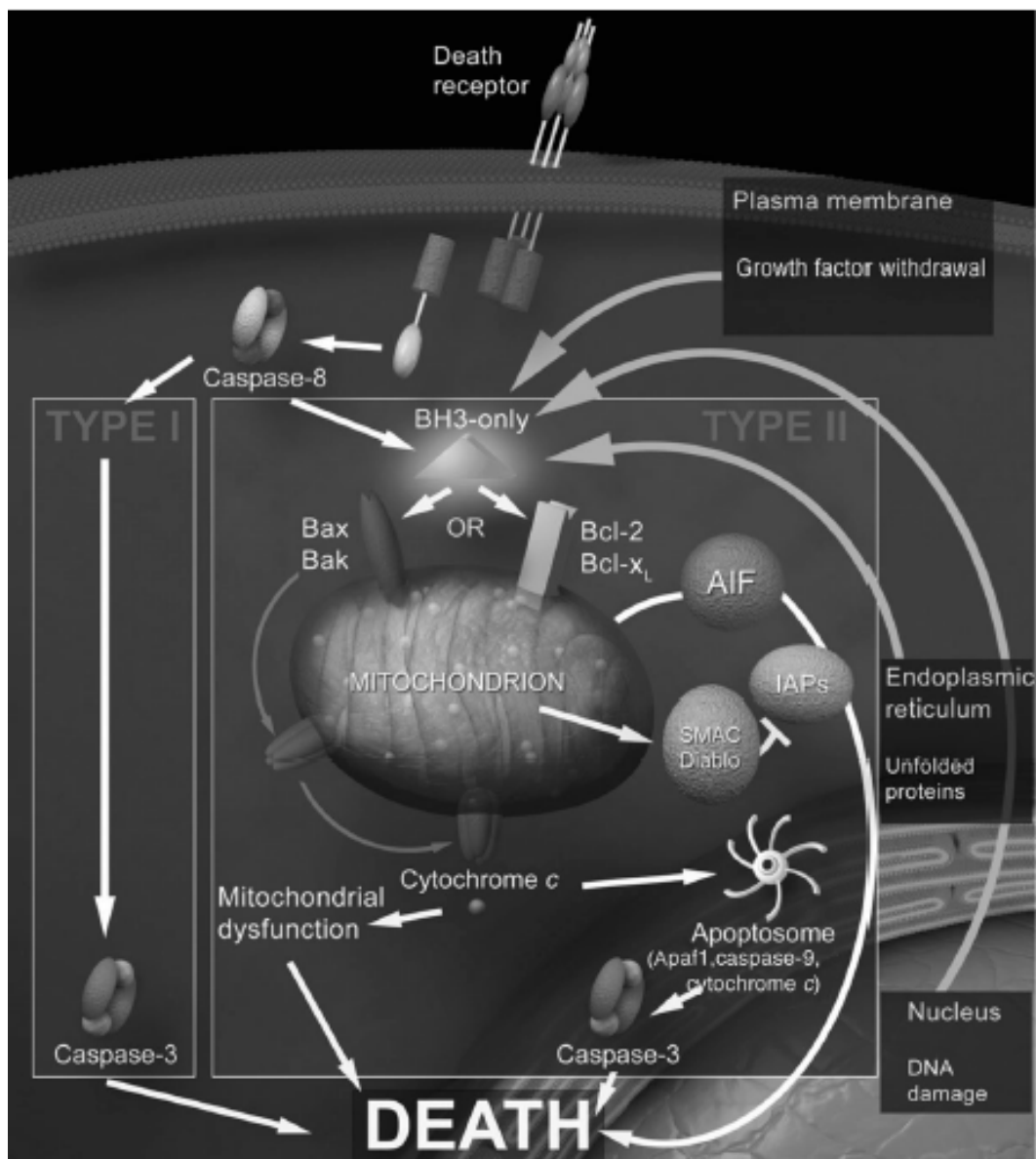


Abbildung 1:
Mitochondrien- und Caspasen-vermittelte Apoptose-Signalwege.
 Aus: Opfermann JT et al; Apoptosis in the development and maintenance of the Immune System, Nature Immunology; 4(5):410-15

Alternativ können auch pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-Familie (BAX u.a.) aktiviert werden. Diese führen zur Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien, was wiederum die Formierung von Apoptosomen, hochmolekulare Komplexe aus APAF-1 (*apoptotic-protease-activating factor-1*) und Caspase-9, auslöst.

Auch für die Inaktivierung der apoptotischen Kaskade sind spezifische Enzyme verantwortlich. Auf diese soll im Detail nur auf die für den Fas/FasL-Weg relevanten eingegangen werden.

1.1.3) Der Fas-Signalweg: Fas, FasLigand und Bcl-2

Für das grundlegende Verständnis der Relevanz der untersuchten Gene im Rahmen der autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen ist eine Übersicht der intrazellulären Signalwege der Fas-induzierten Apoptose und deren Aktivierungs- und Inhibierungsmöglichkeiten obligat.

FasLigand (FasL, CD 178) ist ein 40-kDa großes Mitglied der Familie der Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF), das erstmals im Zusammenhang mit zellvermittelter Zytotoxizität gegen virusinfizierte Zellen auf aktivierten T-Lymphozyten nachgewiesen wurde. Das FasLigand-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 1 lokalisiert mit einer Gesamtlänge von 9 kb, gegliedert in 4 Exons und 3 Introns.

Sein Rezeptor Fas (APO-1, CD 95) ist ein transmembranäres Typ-I-Protein von 45 kDa Größe, ebenfalls aus der TNF-Familie, das auf myeloischen und lymphoblastischen Zellen sowie auf Fibroblasten, verschiedenen Karzinom-Zelllinien und einigen nicht-lymphatischen Organen exprimiert wird^{23,24}. Fas ist auf Chromosom 10q24.1 lokalisiert und besteht aus 9 Exons über eine Gesamtlänge von 26 kb.

Fas und FasL sind am Aktivierungs-induzierten Tod von T-Lymphozyten, an der Toxizität zytotoxischer T-Lymphozyten und an der peripheren Deletion autoreaktiver T-Lymphozyten beteiligt²⁵. Auf diesem Weg spielt das Fas/FasL-System eine wichtige Rolle im Schutz der Gewebe vor Schaden durch infiltrierende Lymphozyten.

Durch die Bindung von FasL an Fas bilden sich Homotrimere aus, die damit in einen aktivierten Status überführt werden. An der intrazellulären Domäne, der *death domaine* (DD), bildet sich ein *death-inducing signaling complex* (DISC) aus einem freien *Fas-associating protein with a death domain* (FADD, MORT1) und einem Proenzym der Caspase-8 (FLICE). Dieser Komplex interagiert wiederum mit weiteren Procaspasen-8^{26,27}, die durch proteolytische Autoaktivierung in die aktivierte Form der Caspase-8 überführt werden, einem Schlüsselenzym in der Auslösung der Caspasen-Kaskade, die zur Ausführung der Apoptose führt.

Dies kann auf zwei Wegen geschehen: Die direkte Aktivierung der Caspase-3 bewirkt die Degradation von zytoplasmatischen und nukleären Proteinen und die Freisetzung der *caspase-activated DNase* (CAD), einer Endonuklease, die die Lyse der chromosomalen DNA bewirkt. Auf dem zweiten Weg wird von Caspase-8 aus dem pro-apoptischen Bcl-Mitglied Bid ein 15kDa großes Fragment freigesetzt, das in die Mitochondrienmembran integriert wird und die Freisetzung von Cytochrom c ermöglicht. Cytochrom c dient der Amplifikation des apoptotischen Signals, da es mit Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*), Procaspase-9 und dATP einen Komplex, das Apoptosom, bildet. Dieses wiederum aktiviert beginnend mit Caspase-9 weitere Effektor-Caspasen¹.

Substrate dieser Effektor-Caspasen sind zwei Gruppen von Proteinen: Regulatorische Moleküle (Proteinkinasen, Procaspasen, Phospholipase A2 u.a.) und strukturelle bzw. sogenannte *housekeeping proteins* (Aktin, Lamine, Topoisomerasen u.a.)¹. Während regulatorische Proteine Rückkopplungsmechanismen auf antiapoptische Moleküle auslösen²⁸ –so zum Beispiel die Überführung des anti-apoptischen Bcl-2 in ein pro-apoptisches Protein²⁹–, führt der Abbau struktureller Proteine zur Disintegration der Zelle und den typischen histologischen Veränderungen der Apoptose.

Diese Kaskade kann jedoch an verschiedenen Punkten unterbrochen werden.

So kann die Aktivierung der Caspase-8 direkt verhindert werden: FLASHs (*FLICE-associated huge proteins*) interagieren unmittelbar mit der *death domain* (DD) der Caspase-8³⁰, während *cytoplasmatic FLICE inhibitory proteins* (c-FLIPs) die Formierung des DISC^{31,32} blockieren. Diese Form der Suppression herrscht in ruhenden T-Zellen und während der frühen Phase der Immun-Aktivierung vor. Im Verlauf der Immunantwort lässt die Expression der c-FLIPs jedoch nach, woraus die Apoptose der Lymphozyten resultiert³³.

Eine zweite Möglichkeit zur Verhinderung dieser Apoptosekaskade besteht in der Aktivierung anti-apoptotischer Mitglieder der Bcl-Familie (z.B. Bcl-2 und Bcl-X) und deren Blockade des Angriffs von BAX an den Mitochondrien und der nachfolgenden Freisetzung von Cytochrom c. Bcl-2 wurde primär als Proto-Onkogen bei B-Zell-Lymphomen am Breakpoint t(14:18) entdeckt, wo es durch die Suppression von Apoptose die Vermehrung der B-Zellklone ermöglicht. Seine Wirkung beruht hauptsächlich auf der Stabilisierung der Mitochondrienmembran und der Verhinderung des Austretens von Cytochrom c¹. Ein zweiter Wirkungsweg wird in der Inhibierung der Caspase-9-induzierten Kaskade durch die Inaktivierung des Komplexbildners Apaf-1 vermutet¹. Eine Überexpression von Bcl-2 kann experimentell die Auslösung von Apoptose durch verschiedene Stimuli wie Glukokortikoide³⁴, Gamma-Bestrahlung³⁵, Hypoxie³⁶ oder den Entzug von Wachstumsfaktoren³⁷ verhindern.

Die Potenz des Bcl-2 zur Blockierung Fas-induzierter Apoptose zeigte in einigen Studien eine Abhängigkeit von dem untersuchten Zelltyp^{38,39}. Die Ursache hierfür liegt möglicherweise im unterschiedlichen Ablauf der apoptotischen Kaskade, die nur im einen Fall die Bcl-2-sensitive Freisetzung von Cytochrom c erfordert. Hierbei ist vor allem ein Modell von Bedeutung, das von der Existenz zweier verschiedener Zelltypen ausgeht, die auf den gleichen apoptotischen Stimulus unterschiedlich reagieren. In Typ I-Zellen folgt demnach auf die Aktivierung der Caspase 8 durch den DISC direkt die Aktivierung der Caspasen-Kaskade, während die Induktion der Apoptose in Typ II-Zellen von der Aktivierung pro-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie und Involvierung der Mitochondrien abhängt. Nur in Typ II-Zellen sei deshalb eine Verhinderung der Apoptose durch Bcl-2 möglich⁴⁰.

Ein anderes Modell basiert darauf, daß nicht die Zellart sondern die Art der Apoptoseinduktion darüber entscheidet, welche Kaskade eingeschlagen wird. Dabei führen spezifische Todesrezeptoren über die Caspasen-Kaskade zur Apoptose (definiert als *extrinsic pathway*), während unspezifischer Streß, wie der Entzug von Wachstumsfaktoren, Bestrahlung oder Hypoxie über den sogenannten *intrinsic pathway* Mitochondrien-vermittelt abläuft⁴¹.

1.2) Immunsystem und Autoimmunerkrankungen

1.2.1) Reifung und Funktion des Immunsystems

Das Immunsystem besteht aus lymphoiden Organen, Immunzellen und Mediatoren, deren Hauptaufgaben in der Erkennung und Elimination körperfremder Strukturen, der Modulation akuter Entzündungsreaktionen und der Wundheilung liegen.

Das Immunsystem wird eingeteilt in angeborene/natürliche und erworbene Immunabwehr, die sich in mehreren Charakteristika grundlegend unterscheiden.

Natürliche Immunität wird vor allem durch Makrophagen, polymorphkernige Neutrophile und natürliche Killerzellen vermittelt, die kontinuierlich und daher schnell verfügbar sind und relativ unspezifisch sowohl gegen virale als auch bakterielle Angriffe gerichtet sein können. Ihre Hauptaktivität besteht in der Erkennung und Phagozytose des eingedrungenen Antigens, das intrazellulär durch lysosomale Enzyme zerstört wird. Während natürliche Killerzellen hauptsächlich antivirale Komponenten angreifen, wirken Neutrophile und Makrophagen vorwiegend durch Phagozytose von Bakterien. Sie sind außerdem in der Lage, das Complement-System zu aktivieren und in der Leber die Produktion von Akute Phase-Proteinen zu induzieren, die Toxine neutralisieren und Zellschäden vermeiden können. Darüber hinaus produzieren sie Interferone mit antiviraler Wirkung.

Allerdings verfügt die angeborene Immunität über keinerlei Möglichkeiten, ein Gedächtnis für bereits überwundene Infektionen zu bilden und sieht sich jeder wiederholten Infektion erneut ausgesetzt.

Spezifische Immunität hingegen basiert auf einem komplexen System aus Antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells/* APCs), Lymphozyten und Immunglobulinen. Es reagiert langsamer, mit einer Latenz von mehreren Tagen bis Wochen, zeigt aber eine sehr hohe Spezifität für die jeweilige Immunsituation und kann ein immunologisches Gedächtnis in Form von Antikörpern und Memory-Zellen aufbauen, die im Fall einer erneuten Infektion mit dem gleichen Erreger rasch und effizient zur Verfügung stehen.

Die Zellen der spezifischen Immunantwort werden in den primär lymphatischen Organen aus lymphoiden Stammzellen (LSCs) in zwei Subpopulationen differenziert: im Knochenmark entstehen B-Lymphozyten, im Thymus entwickeln sich T-Lymphozyten. Beide Populationen ähneln sich unter mikroskopisch-histologischen Bedingungen, unterscheiden sich jedoch in ihrer Ausstattung mit Oberflächenmolekülen.

B-Lymphozyten beginnen noch im Knochenmark mit der Expression des B-Zell-Rezeptor-Komplexes (BCR), bestehend aus IgM/IgD-Antikörpern und zwei akzessorischen Heterodimeren. Dieser Komplex kann Antigene direkt erkennen und binden.

LSCs, die den Thymus erreichen, werden mit einer Vielzahl an Oberflächenrezeptoren ausgestattet: Allen gemeinsam ist ein T-Zell-Rezeptor-Komplex (TCRC) aus einem Polypeptid-Heterodimer (eigentlicher *T-cell-receptor/* TCR) und einem Molekül CD3 (*cluster of differentiation 3*) als Charakteristikum für T-Lymphozyten.

Lymphozyten, die keinen funktionellen BCR/TCR entwickeln, empfangen keine anti-apoptotisch wirksamen Signale und gehen durch Apoptose zu Grunde (*death by neglect*).

Jeder TCR ist spezifisch auf die Detektion einer bestimmten Proteinstruktur gerichtet. Durch randomisierte Prozessierung und *rearrangement* der Gensequenz entsteht bei der Expression der TCR-Heterodimere eine große Vielfalt, bei der für jede denkbare Aminosäure-Sequenz

ein TCR vertreten ist. Um eine Reaktion der T-Lymphozyten mit körpereigenen Proteinen zu verhindern, durchlaufen die TCs zwei Stufen der Reifung: positive und negative Selektion. Dies ist ein Prozeß, der zur Elimination autoreaktiver Lymphozyten führt und daher als zentrale Toleranzentwicklung bezeichnet wird. Im ersten Schritt, der positiven Selektion, werden die TCs, die eine schwache Interaktion mit MHC aufweisen, vor der Phagozytose durch Makrophagen bewahrt. Im zweiten Schritt, der negativen Selektion, werden die TCs mit APCs in Kontakt gebracht, deren MHC-Komplexe körpereigene Antigene tragen. Die Lymphozyten, die mit diesen Komplexen interagieren, werden zum Tod durch Apoptose angeregt. Die verbleibenden Zellen reagieren also schwach mit MHC-Molekülen, erkennen jedoch körpereigene Antigene nicht.

Desweiteren exprimieren TCs akzessorische Rezeptoren verschiedener CD-Subgruppen, die eine Einteilung aufgrund des CD-Expressionsmusters zulassen. Zu Beginn der Differenzierung im Thymus exprimieren alle T-Lymphozyten zwei spezifische CD-Subgruppen: CD4 und CD8, und werden daher als dp-TCs (*double positive T-cells*) bezeichnet. Beim Verlassen des Thymus unterscheidet man zwischen T-Helfer(T_H)-Zellen, die CD 4, und zytotoxischen T-Zellen (T_C), die CD 8 exprimieren.

In den sekundären lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten und lymphoide Gewebe) erhalten diese Zellen dann Kontakt zu Fremd-Antigenen, die ihnen von Antigenpräsentierenden Zellen dargeboten werden. Entsteht dabei eine Interaktion mit Lymphozyten, die spezifisch gegen das dargebotene Antigen gerichtet sind, werden diese aktiviert und mit Hilfe von ko-stimulatorischen Rezeptoren und Zytokinen zu klonaler Expansion angeregt. Dies geschieht maßgeblich durch eine erhebliche Beschleunigung des Zellzyklus (bis zu einer Teilungsfrequenz von $1x/7h$)⁴² und der Vermeidung von Apoptose. In dieser Entwicklungsstufe spielen die ko-stimulatorischen Moleküle (CD28 im Fall der TCs, CD40 bei BCs)^{43,44} sowie Zytokine⁴⁵, insbesondere Interleukine, eine entscheidende Rolle als Überlebens- und Wachstumsfaktoren, indem sie die Expression anti-apoptotischer Gene der Bcl-2-Familie stimulieren^{46,47}. Durch diese Expansion entstehen viele genetisch identische Lymphozyten der Spezifität für das detektierte Antigen und potenzieren so die Immunantwort.

Die initiale Aktivierung verläuft bei BCs und TCs auf unterschiedlichen Wegen.

B-Lymphozyten können durch ausreichend große und Epitop-reiche Antigene direkt aktiviert werden oder kleine Antigene phagozytieren und in MHC I- Komplexen an T_H -Zellen präsentieren. Durch die dabei involvierten Ko-Stimulatoren und Zytokine aus den T_H -Zellen werden die BCs sekundär aktiviert. Im Rahmen der anschließenden Expansion können zwei Wege eingeschlagen werden: Die BCs verbleiben als ruhende Gedächtnis-Zellen (B_{Mem}) oder differenzieren unter dem Einfluß von IL-2 zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen (PCs) aus.

T-Lymphozyten reagieren unabhängig von Größe oder Variabilität ausschließlich auf Antigene, die in Verbindung mit MHC-Molekülen auf der Membran von APCs präsentiert werden. Der TCR erkennt den Komplex aus Fremdanigen und MHC und induziert die Aktivierung der T-Lymphozyten. Dabei interagiert MHC Klasse I, das auf allen Körperzellen exprimiert wird und zur Präsentation zelleigener Strukturen oder viraler Antigene dient, ausschließlich mit CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten. Diese haben nach Aktivierung zwei Möglichkeiten, den Untergang der als infiziert erkannten Zelle einzuleiten: Durch Aktivierung der Apoptose-Kaskade über TNF/RNFR-Interaktion beziehungsweise den Fas/FasL-Mechanismus⁴⁸ oder über die Ausschüttung der Serinprotease Granzym B, die wiederum durch proteolytische Spaltung mehrere Caspasen (-2, -3, -7, -8 und -10) aktivieren kann^{1,49}.

MHC der Klasse II, das nur auf APCs exprimiert wird, dient der Präsentation körperfremder, meist bakterieller Antigene an CD4⁺ T_{H0}-Zellen. Nach Art der immunologischen Antwort wird hierbei unterschieden zwischen T_{H1}-Zellen, die vor allem durch die Ausschüttung von IFN- γ Makrophagen aktivieren und den T_{H2}-Zellen, deren Interleukin-Freisetzung (-2, -4, -6) eine Unterstützung der BC-Antwort vermittelt. Je nach genetischer Prädisposition und exogenen Zusatzfaktoren kann man ein Überwiegen jeweils einer der beiden Reaktionsarten beobachten. So favorisiert ein Milieu, in dem IFN- γ und IL-12 überwiegen, die Differenzierung in T_{H1}, ein Überwiegen von IL-4 die Reifung von T_{H2}-Lymphozyten. Im physiologischen Gleichgewicht liegen T_{H0}, T_{H1} und T_{H2} etwa im Verhältnis 4:2:1 vor, im Rahmen vieler Autoimmunerkrankungen liegt eine lokale Störung dieses Gleichgewichts vor und es dominiert die T_{H1}- oder die T_{H2}-vermittelte Immunreaktion.

	TH1	TH2
Schlüsselzytokine		
IL-1	++	++
IL-2	+++	--
IL-4	--	+++
IL-5	--	+++
IL-10	+	+++
IL-13	--	+++
IFN- γ	+++	--
Chemokine	CCR5	CCR3, 4, 8
Hauptfunktion	zell-vermittelte Immunantwort	Antikörper-Produktion, Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen
Aktiviert durch	IFN- γ , IL-12	IL-4
Inhibiert durch	IL-4	IFN- γ , IL-12

Tabelle 1:
Charakteristika von T_{H1}- und T_{H2}-Zellen
 Nach: Weetman PA, Clin Endocrinol 2004; 61(4):405-13

1.2.2) Autoimmunität

Die Aktivität des Immunsystems sollte ausschließlich gegen körperfremde Strukturen gerichtet sein und körpereigene Proteine sollten nicht angegriffen werden. Mit einer Inzidenz von etwa 3 bis 5% treten jedoch Autoimmunerkrankungen auf.

Autoimmunität wird charakterisiert durch die Aktivierung autoreaktiver Lymphozyten, die sich spezifisch gegen endogene Peptide wenden oder die Bildung von Auto-Antikörpern einleiten. Zu Grunde liegend ist somit ein Zusammenbruch oder eine Einschränkung der Differenzierungsfähigkeit nach körpereigen und körperfremd, die sowohl in der Inkompetenz der Immunozyten als auch in einem fehlenden Schutzmechanismus des körpereigenen Gewebes begründet sein kann.

Körpereigene Zellen schützen sich vor Phagozytose im Rahmen der angeborenen Immunantwort durch die Präsentation spezifischer Zuckermoleküle auf der Zellmembran, die eine Phagozytose unmöglich machen. Um einen Schutz körpereigener Zellen vor der spezifischen Immunantwort zu erreichen, müssen Lymphozyten in der Lage sein, eine Differenzierung in „selbst“ und „fremd“ vorzunehmen. Dies wird auf verschiedenen Wegen erreicht:

Während der Reifung des Immunsystems entwickelt sich mittels positiver und negativer Selektion (siehe 1.2.1) die so genannte zentrale Toleranz, die das Auftreten autoreaktiver Lymphozyten generell verhindern soll. Im Falle des Versagens der zentralen Toleranz stehen dem Körper durch die periphere Toleranz –*immunological ignorance*, *clonal anergy* und *homeostatic control*– weitere Mechanismen zur Verfügung, die Aktivierung potentiell autoreaktiver Lymphozyten zu umgehen. *Immunological ignorance* bezeichnet die Situation, in der die Menge oder die Fragmentgröße autologer Antigene nicht ausreicht, um eine Aktivierung der TC auszulösen, diese werden ignoriert. *Clonal anergy* beruht darauf, daß zur Aktivierung von TCs eine Kostimulation durch Korezeptoren und/oder Zytokine nötig ist. Bleibt dieser additive Effekt aus, findet keine Expansion statt. *Homeostatic control* entsteht durch die Expression von CTLA-4 (cytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4) auf aktivierten T-Zellen, das zu einer Inaktivierung nach Kontakt mit APCs führt⁵⁰.

Eine weitere Rolle spielen T-Suppressor-Zellen, die durch direkte Interaktion mit TCs und BCs die Immunantwort modulieren und unterdrücken können.

Die genaue Ätiologie der Autoimmunität ist bisher ungeklärt. Durch zahlreiche Studien konnten bisher einzelne Faktoren identifiziert werden, die zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen prädisponieren oder auslösende Faktoren darstellen. Verschiedene Umwelteinflüsse scheinen in unterschiedlichem Ausmaß am Auftreten der Erkrankungen beteiligt zu sein, insbesondere wurde ein Zusammenhang mit Medikamenteneinnahme (Amiodaron, IFN-alpha), Infektionen^{51,52}, Stress⁵³, Sexualhormone und Nikotinabusus⁵⁴ beschrieben, auf genetische Faktoren soll im Abschnitt 1.5.3) detailliert eingegangen werden. Insgesamt wird von einer multifaktoriellen Genese aus genetischer Prädisposition und exogenem Trigger ausgegangen.

Potentielle Mechanismen für den Zusammenbruch der immunologischen Toleranz sind zahlreich. Sie liegen im Versagen der dargestellten zentralen oder peripheren Toleranz-Mechanismen, die zur Elimination autoreaktiver T-Lymphozyten führen, im Eintreten von Kreuzimmunität in Form eines *molecular mimicry*, bei dem BCs und TCs gegen körpereigene Polypeptide reagieren, die ihren mikrobiellen Zielantigenen strukturell stark ähneln (bei Myasthenia gravis, rheumatischem Fieber, eventuell auch für DM1 oder MS postuliert)^{55,56} oder in der Umgehung von Kontrollmechanismen, z.B. durch das Auftreten so genannter *cryptic epitopes* – Antigene intrazellulärer Proteine, die im Rahmen eines massiven Zellsterbens (z.B. bei Infektion mit dem Mumps-Virus) den Immunzellen plötzlich extrazellulär präsentiert und deshalb als fremd erkannt werden⁵⁷. Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung ursprünglich aneurer autoreaktiver BCs besteht in der akzidentiellen Ko-Aktivierung während einer unspezifischen polyklonalen B-Zell-Expansion, wie sie zum

Beispiel im Rahmen einer Infektion mit EBV auftritt. Außerdem kann eine Expression von MHC II auf somatischen Zellen, die physiologischerweise nur MHC I tragen, dazu führen, daß den TH-Zellen Antigene körpereigener Proteine dargeboten werden. Schließlich können sich auch opsonierende Antikörper, die im physiologischen Gleichgewicht Antigene geringer Größe binden, um sie für Phagozyten detektierbar zu machen, gegen körpereigene Strukturen richten und diese präsentieren.

Die Therapie von Autoimmunerkrankungen musste sich lange auf die Suppression des Immunsystems durch den Einsatz von Corticoiden, NSAIDs und Cyclosporin/ Azathioprin beschränken. Die Entwicklung spezifischer immunmodulatorischer Therapien gestaltet sich schwierig, so lange die zu Grunde liegenden Pathomechanismen nur unzureichend verstanden sind. So sind beispielsweise eine Inhibierung kostimulatorischer CD-Moleküle oder die Supprimierung regulatorischer Zytokine denkbar. Für die Therapie der Multiplen Sklerose wurde die Applikation von IFN- β) bereits klinisch zugelassen, Antikörper gegen TNF- α oder dessen Rezeptor sind in der Therapie der Rheumatoiden Arthritis etabliert. Die Regulation der Balance der T-Helfer-Zell-Antwort gestaltet sich jedoch schwierig, in ersten tierexperimentellen Ansätzen zeigte sich eine Exazerbation der Erkrankung nach Verschiebung des inflammatorischen Gleichgewichts⁵⁸. Auch die Gentherapie wurde als weiterer Baustein therapeutischer Optionen diskutiert, ist jedoch bisher für den klinischen Einsatz nicht geeignet⁵⁹.

1.2.3) Klassifizierung der Autoimmunerkrankungen

Obwohl sich Autoimmunerkrankungen sowohl im klinischen und molekularen Bild als auch in der möglichen Pathogenese stark unterscheiden, sind ihnen doch das Vorliegen von Autoantikörpern und/ oder autoreaktiven Lymphozyten sowie ein Ansprechen auf eine immunsupprimierende Therapie und eine genetische Assoziation mit Varianten in HLA-Klasse II gemeinsam.

Es gibt mehrere Möglichkeiten, diese äußerst heterogen erscheinende Krankheitsgruppe zu charakterisieren und zu klassifizieren.

Die klassische Charakterisierung erfolgt durch den Nachweis autoreaktiver Lymphozyten, die Antikörper (Ak) gegen körpereigenes Gewebe produzieren und/ oder von T_C-Zellen, die durch körpereigene Peptide aktiviert werden und die Gewebe angreifen.

Klassifiziert werden Autoimmunerkrankungen in organ-spezifische und systemische Formen, wobei auch Übergangsformen mit Affektion mehrerer Organen vorkommen.

Organ-spezifisch	Antigen/e /Gewebe	Nicht-organ-spezifisch	Antigen/e /Gewebe
Hashimoto Thyreoiditis	TPO, Tg	SLE	DNA
IDDM1	β -Zellen	RA	IgG, Bindegewebe
Morb. Addison	Nebennierenrinde	MS	Gehirn, weiße Masse
Morb. Basedow	TSH-R	Sjögren's Syndrom	Exokrine Drüsen, Niere, Leber
Myasthenia gravis	Ach-R		

Tabelle 2:
Klassifizierung der Autoimmunerkrankungen

Organ-spezifischen Autoimmunerkrankungen liegt eine chronische Ak-Produktion oder T-Zell-Aktivierung gegenüber einem spezifischen Organ zugrunde. Systemische Autoimmunopathien sind meist immunkomplex-vermittelt und zeichnen sich dadurch aus, daß die krankheitsverursachenden Autoantigene in vielen oder allen Zellen vorkommen.

Autoimmunerkrankungen betreffen auffallend häufig endokrine Organe wie Pankreas, Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Nebenniere oder die Zirbeldrüse. Obwohl es sich in der Regel um organspezifische Erkrankungen handelt, sind in vielen Fällen mehrere endokrine Organe gleichzeitig betroffen. Besonders häufige Konstellationen werden zu Polyendokrinen Syndromen zusammengefaßt.

Allen Autoimmunendokrinopathien gemeinsam ist die genetische Assoziation mit HLA DR3. Jedoch zeigen auch eineiige Zwillinge bei weitem keine 100%ige Konkordanz, eine ausschließlich genetische Pathogenese ist daher trotz einer hohen Variabilität im genetischen Rearrangement während der Entwicklung des Immunsystems auszuschließen. Man geht daher von einem komplexen genetischen Hintergrund mit einer Triggerung der klinischen Manifestation aus, möglicherweise im Rahmen von Infektionen mit Viren oder Candida. Ein eindeutiger Beweis für die Infektions-Theorie konnte allerdings weder in vivo noch in vitro erbracht werden.

Die ersten beschriebenen Autoimmunendokrinopathien waren die der Schilddrüse, die etwa 30% aller Autoimmunerkrankungen ausmachen und bei etwa 2 bis 4% der Frauen bzw. bis 1% der Männer^{60,61} auftreten. Die Prävalenz erhöht sich mit steigendem Alter, betrachtet man die Subgruppe der über 75jährigen, sind 10% zumindest subklinisch hypothyreot und weisen meist auch autoimmune Merkmale auf^{61,62}.

1.3) Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen

1.3.1) Hashimoto Thyreoiditis: Klinik, Epidemiologie und Therapie

Hashimoto Thyreoiditis zählt zu den chronisch lymphozytären Schilddrüsenentzündungen und stellt die häufigste Ursache für die Entwicklung einer Hypothyreose dar. Sie wurde nach ihrem Erstbeschreiber Hakaru Hashimoto (1881-1934), einem japanischen Chirurgen und Pathologen, benannt.

Es handelt sich um eine Autoimmunerkrankung, bei der im Zuge der Aktivierung autoaggressiver T-Lymphozyten die Bildung humoraler Antikörper gegen die Schilddrüsen-spezifischen Antigene Thyreoglobulin (TAK) und thyreoidale Peroxidase (MAK) induziert wird. In über 90% der Fälle sind diese Antikörper pathognomonisch. Ausgehend von der Antikörper- und Zytokinproduktion des lymphozytären Infiltrats kommt es zu zytotoxischen Reaktionen und Apoptosevorgängen, die Histologie und Klinik bestimmen.

Betroffen sind meist Frauen im mittleren Lebensalter. Häufig sind die Patientinnen beschwerdefrei, weshalb die Erkrankung in der Frühphase oft nicht diagnostiziert wird. Die Inzidenz liegt bei etwa 0,5-1,5 Fälle/ 1000/ Jahr. Jedoch sind beispielsweise etwa 10% der englischen Bevölkerung positiv auf Hashimoto-spezifische Antikörper getestet worden, und auch Neugeborene zeigen –bedingt durch diaplazentare Übertragung– ein ähnlich hohes Auftreten von TPO-Antikörpern. Es ist deshalb davon auszugehen, daß asymptomatische Verläufe wesentlich häufiger sind.

Hashimoto Thyreoiditis tritt familiär gehäuft auf, seltener auch in Kombination mit anderen Autoimmunerkrankungen, im Falle von Hypoparathyreoidismus und Morbus Addison als Autoimmunes Polyendokrines Syndrom-II (APS-II) beschrieben. Neben endogenen Hormonspiegeln, niedrigem Geburtsgewicht, einer überhöhten Jodaufnahme⁶³ sowie Rauchen⁶⁴ und anderen Umwelteinflüssen werden deshalb genetische Prädispositionsfaktoren für die Entstehung verantwortlich gemacht. Für einige genetische Risikomarker wurde bereits eine Assoziation mit der Hashimoto Thyreoiditis nachgewiesen; diese werden im weiteren Verlauf beschrieben.

Der Krankheitsbeginn kann wie oben bereits erwähnt unauffällig verlaufen, in einigen Fällen tritt jedoch initial eine transiente hyperthyreote Phase auf, „Hashitoxikose“ genannt. In diesem Stadium ist die Differentialdiagnose zum Morbus Basedow oft schwierig, zumal auch der TSH-R-Ak-Titer positiv ausfallen kann. Charakteristisch sind jedoch stark erhöhte Konzentrationen der Schilddrüsen-spezifischen Autoantikörper Anti-TPO (in 90% positiv) und Anti-Thyreoglobulin (in ca. 40-70%).

Bei der Untersuchung unterscheidet man eine atrophische Form mit verkleinerter Schilddrüse von einer hypertrophischen Form mit Struma. Sonographisch findet sich in beiden Fällen ein diffus echoarmer Drüsenkörper, der bei fortschreitender Erkrankung auch fibrotisch metaplasieren kann, in der Farbdopplersonographie zeigt sich eine Hypervaskularisation. Zur sicheren Diagnose kann ein histologischer Befund aus der Feinnadelaspirationsbiopsie herangezogen werden. Er enthält ein starkes lymphozytäres Infiltrat, fokal kann es zur Bildung von Keimzentren/ Sekundärfollikeln kommen. Durch die Infiltration mit T-Lymphozyten und Plasmazellen entstehen Lymphknoten, die pathognomonisch für das Krankheitsbild und ebenfalls punktionszytologisch nachweisbar sind.

Die Schilddrüsen-Funktion vermindert sich zunächst nur subklinisch und führt erst schleichend zu einer manifesten Hypothyreose. Diese äußert sich klinisch durch Antriebsarmut bis hin zur Depression, erhöhte Kälteempfindlichkeit, Bradykardie, Gewichtszunahme, teigige Haut und brüchige Haare. Im Serum sind T3 und T4 erniedrigt, das TSH kompensatorisch erhöht mit überschießendem Anstieg im TRH-Test.

Nach Diagnosesicherung sollte die Behandlung bereits im subklinischen Stadium der Hypothyreose beginnen. Eine Substitution mit Levothyroxin sollte einschleichend begonnen werden, da bei zu schneller Substitution die Gefahr der Initiierung von Arrhythmien und Angina pectoris-Anfällen besteht. Deshalb ist initial eine Dosis von 25-50 µg/d indiziert, monatlich sollte diese um 25 µg/d erhöht werden, bis eine Erhaltungsdosis von etwa 1,5-2 µg/kg/d erreicht ist. Therapieziel sind ein basales TSH im unteren bis mittleren Normbereich ohne überschießende TSH-Stimulation im TRH-Test und eine subjektive Besserung der Beschwerden verbunden mit einer Stoffwechsellnormalisierung.

1.3.2) Morbus Basedow: Klinik, Epidemiologie und Therapie

Bei Morbus Basedow handelt es sich um eine autoimmun bedingte Hyperthyreose. Aufgrund einer genetischen Prädisposition (s. u.) und einem bisher unbekanntem auslösenden Agens kommt es zur Produktion von Autoantikörpern, die am TSH-Rezeptor schilddrüsen-stimulierend wirken –lange wurde eine virale Genese angenommen, heute geht man von einem starken Einfluß hormoneller Faktoren aus.

In zwei Drittel der Fälle zeigt sich eine Erstmanifestation nach dem 35. Lebensjahr. Frauen sind fünfmal häufiger betroffen als Männer. In einer Schwangerschaft ist die diaplazentare Übertragung der Antikörper möglich, weshalb es zum Auftreten transients Symptome in der Postpartal-Phase kommen kann.

Klinische Zeichen der Hyperthyreose sind bei 70-90% der Patienten die Struma mit einer starken Vaskularisation, die auskultatorisch ein Schwirren erzeugen kann. Psychomotorische Unruhe mit einem feinschlägigen Tremor, Sinustachykardie, gesteigerte Stuhlfrequenz und Gewichtsverlust trotz Heißhunger als Ausdruck des gesteigerten Grundumsatzes treten auf. Charakteristisch für die Differentialdiagnose zu einer Hyperthyreose anderer Genese ist die endokrine Orbitopathie bei 60% der Patienten und gelegentlich das Auftreten eines prätibialen Myxödems (etwa 5% der Fälle). In der Labordiagnostik zeigt sich ein basal erniedrigtes TSH, fT3 und fT4 sind fast immer erhöht und TSH-Rezeptorantikörper (TRAK) können in mehr als 95% nachgewiesen werden. Sonographisch stellt sich eine umschriebene und diffuse Echoarmut mit einer Hypervaskularisation im Farbduplex dar.

Therapeutisches Ziel ist ein euthyreoter Stoffwechselstatus. Dies wird zunächst mit Thyreostatika erreicht, die die Synthese der Schilddrüsenhormone hemmen. Bei stark ausgeprägter Struma mit Kompressionserscheinungen kann operativ nach Erreichen der Euthyreose eine subtotale Resektion unter Erhalt von etwa 2ml Restgewebe stattfinden. Alternativ kann die funktionelle Ausschaltung des Schilddrüsengewebes auch über eine Radiojodtherapie mit ¹³¹J erfolgen. Prognostisch bedeutend ist die anschließende engmaschige Verlaufskontrolle, da ggfs. eine Substitutionstherapie einzuleiten ist.

1.4) Bedeutung der Apoptose in der Schilddrüsenautoimmunität

1.4.1) Bedeutung der Apoptose in der Immunpathologie

Im Rahmen der Reifung des Immunsystems (1.2.1) wurde die Bedeutung der Apoptose für die Entwicklung und Aktivierung der Lymphozyten bereits dargestellt. Auch wenn Apoptose wohl in der Entwicklung jeder Zell-Linie von funktioneller Relevanz zu sein scheint, kommt ihr insbesondere bei der Entstehung der Immunantwort eine elementare Funktion zu. Mutationen und Polymorphismen in Genen von pro- und anti-apoptotischen Proteinen wurden der Entwicklung von Immundefizienz-Syndromen, Autoimmunität und malignen Tumoren zugeordnet⁶⁵.

Prinzipiell ist ein Versagen in der Regulation des pro-/ anti-apoptotischen Gleichgewichts und damit die Entwicklung von immunologischen Erkrankungen durch eine Überproliferation oder einen Mangel an immunkompetenten Lymphozyten in jedem dieser Reifungs-Schritte möglich.

Auch bei der Aufrechterhaltung eines kompetent entwickelten Immunsystems spielen Apoptose-Signalwege eine entscheidende Rolle. Diese besteht zum Einen in der Vermeidung des Zelltods während der Lymphozyten-Expansion im Rahmen der Immunantwort. Zum Anderen wird nach Elimination des verursachenden Pathogens die Beendigung des Immunangriffs und die ebenso rasche wie effiziente Dezimierung der Zahl aktiver Immunzellen unter gleichzeitiger Erhaltung der naiven Lymphozyten und Memory-Zellen durch selektive Apoptose vermittelt. Dies wird erreicht durch eine Reduktion der Signaltransduktion von Antigen-Rezeptor und Ko-Rezeptoren, die ihrerseits zu einer verminderten Expression anti-apoptotischer Moleküle und Heraufregulation der Expression pro-apoptotischer Stimuli führt.

Hierbei sind mehrere Schlüsseldefekte innerhalb der apoptotischen Prozesse denkbar.

Ein möglicher Pathomechanismus ist der des *molecular mimicry*. Diese Hypothese geht davon aus, daß nach erfolgreicher Eliminierung eines auslösenden Agens eine Kreuzreaktivität einiger Lymphozyten mit strukturähnlichen, endogenen Antigenen besteht, und diese sich dann gegen körpereigenes Gewebe richten. Werden diese nicht durch eine physiologische Gegenregulation inaktiviert, kann es zum Auftreten autoimmunologischer Prozesse kommen.

Für einige andere Faktoren, die an der Regulation der Apoptose im Immunsystem beteiligt sind, konnte bereits eine genetische Assoziation zu verschiedenen Immunerkrankungen nachgewiesen werden.

So beispielsweise für die *cluster of differentiation* (CDs), kostimulatorische Moleküle des TCRs. CD45 ist eine transmembranäre Tyrosin-Phosphatase, die intrazellulär an der Down-Regulation des Signals des T-Zell-Antigenrezeptors beteiligt ist. Mäuse mit einer Punktmutation, die CD45 inaktiviert, zeigen eine polyklonale Lymphozytenhyperproliferation und produzieren Autoantikörper. Untersuchungen von Patienten mit *severe combined immunodeficiency* (SCID) und Multiple Sklerose (MS) zeigten ebenfalls Mutationen, die zu einem Funktionsverlust des CD45 führen, und legen einen kausalen Zusammenhang nahe^{66,67}. Auch das zytotoxische T-Lymphozyten Antigen-4 (CTLA-4), ein Mitglied der CD28-Familie, spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Immunproliferation. CTLA-4-defiziente Mäuse entwickeln während des ersten Lebensmonats starke Lymphozyten-Infiltrate, die zu Organ-Destruktion führen⁶⁸. Der zu Grunde liegende Pathomechanismus ist noch nicht vollständig erklärt, diskutiert werden die Konkurrenz mit CD28 selbst um gemeinsame Liganden oder eine direkte Induktion der Apoptose. Für den Morbus Basedow

sowie für einige weitere Autoimmunerkrankungen konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Varianten des CTLA-4-Gens und dem gehäuften Auftreten der Erkrankung gezeigt werden (siehe 1.5.3).

Für die Bedeutung insbesondere des Fas/FasL- und Bcl-2-regulierten Zelltods bei Erkrankungen des Immunsystems gibt es überzeugende Hinweise:

Auf ruhenden T-Lymphozyten wird der pro-apoptotische Fas-Rezeptor in geringem Umfang exprimiert. Während der initialen Phase der T-Zell-Aktivierung wird die Expression gesteigert, führt jedoch nicht zur Einleitung des Zelltods, da während dieser Phase auch die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und FLIP in hohen Konzentrationen exprimiert werden. Wenn im Verlauf der erfolgreichen Immunantwort Kontakte mit antigenpräsentierenden Zellen seltener werden und Stimulation an TCR/ BCR und den Kostimulatoren nachlässt (in vitro tritt dieser Effekt nach etwa 5 bis 6 Tagen ein), wird die Expression anti-apoptotischer Bcl-2 und FLIPs reduziert, während die der pro-apoptotischen Moleküle induziert wird^{69,70}. Die Lymphozyten sind nun sensitiv für eine Apoptose-Induktion durch FasL, der in einem inflammatorischen Milieu auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird.

Des Weiteren unterstützen die Beobachtungen an Mäusen, die Fas-defizient sind oder eine Mutation in Fas (lpr Mäuse) oder FasL (gld Mäuse) tragen, die Beteiligung der Apoptose an der Regulation des Ausmaßes der Immunantwort. Denn diese Mäuse bilden ein Lymphoproliferatives Syndrom aus (*lymphoproliferation, generalized lymphoproliferative disease*) oder zeigen Autoimmunerkrankungen, zu denen korrespondierende Erkrankungen des Menschen bekannt sind¹. Ähnliche klinische Bilder entstehen auch bei Mutationen in den Genorten, die downstream-Moleküle des Fas/FasL-Signalswegs kodieren, beispielsweise die Caspasen 8 und 10^{71,72}. Dennoch scheint die Ausprägung des jeweiligen Syndroms einem multifaktoriellen Erbgang zu unterliegen, möglicherweise sogar durch eine Beeinflussung verschiedener apoptotischer Signalwege zustande zu kommen^{73,74}.

Beim Menschen konnte eine Assoziation der Fas/FasL-induzierten Apoptose mit der Pathogenese diverser Autoimmunerkrankungen gezeigt werden. So findet sich bei 50% der Patienten des Multiplen Autoimmunen Syndroms, in deren direkten Verwandtschaftskreis mehr als ein Fall einer Autoimmunerkrankung auftrat, ein Defekt der Fas-Funktion⁷⁵. Auch beim vereinzelt Auftreten folgender Autoimmunerkrankungen ist das Fas-System beteiligt: Typ I Diabetes Mellitus (IDDM1), Multiple Sklerose (MS), Rheumatoide Arthritis (RA), Sjögren's Syndrom (SS), Colitis ulcerosa (UC), Spondylitis ankylosans (SA) und Autoimmunhepatitis⁷⁶. Im Falle von IDDM1 und MS konnte besonders bei aggressiven Verlaufsformen oder in Assoziation mit Thyreoiditis bei bis zu 70% der Patienten eine defekte Fas-Funktion nachgewiesen werden^{77,78}. Da in all diesen Fällen der Fas-Defekt auch bei mindestens einem Elternteil nachzuweisen war, ist von einer hereditären Genese auszugehen.

Im Falle der Schilddrüsenautoimmunität liegen eindeutige Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang zwischen aberranter oder unkontrollierter Expression von Fas/FasL und dem Auftreten der Hypo- bzw. Hyperthyreose vor, wie in 1.4.2) gezeigt werden soll. Eine genetische Assoziation konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden.

Neben der Beteiligung pro-apoptotischer Fas-Moleküle ist auch eine mögliche Relevanz anti-apoptotischer Mediatoren im Rahmen dieses Signalweges denkbar und soll untersucht werden. Bcl-2, Bcl-XL und Bid sind direkt am Fas-Signalweg beteiligt, während andere antiapoptotisch wirksame Mitglieder der Bcl-Familie an anderen Kaskaden angreifen.

Bcl-2 scheint besonders bei der Aktivierung der Immunantwort eine entscheidende Rolle zu spielen. Bcl-2-defiziente Mäuse zeigen eine normale Hämatopoese, entwickeln jedoch eine gestörte Lymphozyten-Homöostase und eine Immundefizienz⁷⁹, die aus einer fulminanten Apoptose der Lymphozyten nach Antigenstimulation resultiert. Andererseits kann eine Überexpression des Bcl-2 die negative Selektion nach endogener Antigenpräsentation im Thymus zwar nicht vollständig unterdrücken, ist jedoch suffizient, Apoptose zu supprimieren, und unterstützt so auch beispielsweise die erhöhte Inzidenz von Tumorerkrankungen⁸⁰.

1.4.2) Pathomechanismus der Schilddrüsenautoimmunität

Über die generelle Bedeutung im Rahmen von Reifung und Funktion des Immunsystems hinaus wird der Apoptose zunehmend auch in der lokalen Manifestation organspezifischer Autoimmunerkrankungen eine wichtige Funktion zugeschrieben. Aufgrund der Annahme, die Hyperplasie oder Atrophie des betroffenen Organs werde durch eine Störung der Balance im apoptotischen Gleichgewicht ausgelöst, wurde das Ausmaß und die Beteiligung der Apoptose auch in Schilddrüsenerkrankungen evaluiert. Dabei zeigte sich ihre zentrale Rolle in der Pathogenese der Schilddrüsenautoimmunität⁸¹, insbesondere in der späten Phase der Erkrankung, in der bedingt durch den Entzündungsprozess ein Überlebenskampf zwischen infiltrierenden Lymphozyten und dem Schilddrüsengewebe über die klinische Manifestation entscheidet⁸².

In gesundem Schilddrüsengewebe werden bereits in physiologischem Milieu geringe Mengen an apoptose-induzierenden Rezeptoren exprimiert, aber durch eine ausreichend hohe Expression der Fas-assoziierten Phosphatase-1 (FAP-1) ausgeglichen, die an die negativ regulatorische Domäne des CD95 bindet und so die Apoptose blockiert. So zeigt sich in vivo in gesunden Schilddrüsen nur ein geringer Turnover, also auch nur wenig Apoptose, während bei Thyreoiditis die Apoptose-Rate deutlich erhöht ist.

Bei der Organdestruktion im Rahmen autoimmuner Schilddrüsenerkrankungen werden –anders als bei der Apoptoseinduktion durch Strahlung oder physikalische Schädigung– Membranrezeptoren durch lösliche oder membrangebundene Liganden aktiviert. Dabei sind vor allem drei Rezeptor-Ligand-Systeme von Bedeutung: TNF, Fas und TRAIL⁸¹. Da die intrazelluläre Kaskade in allen Fällen identisch verläuft, ist an der Untersuchung dieser Kaskade nicht zu unterscheiden, durch welchen Induktor sie ausgelöst wurde.

Mehrere Studien haben insbesondere die Relevanz von Fas/FasL-vermittelter Apoptose in der Entstehung antithyroidaler Autoimmunität belegt^{83,84,85,86,87}. Dabei zeigte sich, daß Thyreozyten einer gesunden Schilddrüse experimentell nicht sensitiv für CD95-Stimulation sind und nur geringe Expression von CD178 zeigen⁸⁸. Bezüglich der Expressionsmuster sind die Analysen jedoch schwierig und kommen daher zu widersprüchlichen Ergebnissen. So gibt es verschiedene Antikörper gegen CD178 mit sehr unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität, die Ergebnisse verschiedener Studien nicht ohne weiteres vergleichbar machen. Darüber hinaus bestehen bei der Untersuchung „gesunder Kontrollen“ Schwierigkeiten darin, daß Thyreozyten –wenn ex vivo kultiviert– spontan vermehrt CD95 exprimieren, gesundes Schilddrüsen-Gewebe aus ethischen Gründen allerdings nur schwer zu asservieren ist und die kontralateralen Lappen aus Carcinom-Resektionen nur bedingt als Negativ-Kontrolle angesehen und ausgewertet werden können.

Die Tatsache, daß die Erkrankungen einen chronischen und sehr langsamen Verlauf zeigen, legt die Annahme nahe, daß der durch die erhöhte Apoptose-Rate bedingt Verlust zunächst

durch Zellersatz ausgeglichen wird. Ebenso ist es möglich, daß ein einzelner auslösender Faktor nicht ausreicht, um einen massiven Zelluntergang zu erreichen und daher die Signalkette verstärkt werden muß, beispielsweise durch die Hemmung intrazellulärer Antagonisten⁸⁹. Ein potentieller Kandidat hierfür wäre Bcl-2, ein anti-apoptotisches Molekül, das in Follikeln, die verstärkt mit Lymphozyten infiltriert sind, in seiner Expression herunterreguliert ist⁸⁴.

Verschiedene tierexperimentelle Modelle für Schilddrüsen-Autoimmunität (experimentelle Autoimmun-Thyreoiditis) konnten auf Basis der genetischen Prädisposition⁹⁰, durch Impfung mit Schilddrüsen-Antigen⁹¹ oder mit Hilfe Schilddrüsen-spezifischer T-Zell-Klone entwickelt werden. Hierbei sollte die zentrale Rolle der CD4 Zellen in der Initiation und die der B-Zellen und Antikörper in der Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion belegt werden. Allerdings kommt es bei diesen Modellen zu keiner signifikanten Destruktion der Thyreozyten, und sie sind daher nur begrenzt auf den Menschen übertragbar. Eine Vorbehandlung der thyroglobulin-reaktiven T-Zellen mit IL-12 und CD25 löst zwar eine ausreichende Destruktion aus, doch führt auch sie nicht zum histologischen Korrelat der HT, vielmehr zu einer granulomatösen Form der Thyreoiditis. Deshalb bleibt der Mensch die primäre Informationsquelle zur Aufklärung der Pathogenese.

Neben dem Einfluß der Apoptose-Rezeptoren stellen Zytokine somit einen weiteren entscheidenden Faktor bei der Ausbildung der verschiedenen Krankheitsentitäten dar. Dabei wirken sie auf zwei Ebenen: Zum einen können sie die Expression pro- oder anti-apoptotischer Moleküle direkt beeinflussen, zum anderen regulieren sie die Immunantwort durch die Schaffung spezifischer Milieus. Aufgrund unterschiedlicher Zytokinproduktionsmustern werden zwei Subgruppen von T_H-Zellen unterschieden: T_{H1} und T_{H2}.

T_{H1}-Zellen sezernieren IFN- γ und andere Mediatoren, die mit zellvermittelter Immunantwort verbunden sind (TNF β , IL-2). IFN- γ aktiviert Makrophagen, fördert CD8-Zell-vermittelte Zytotoxizität und induziert die Expression von MHCII, IL-1, NO und Prostaglandinen. T_{H2}-Zellen hingegen sezernieren IL-4, -5, -10, supprimieren so die Antwort der T_{H1} und aktivieren gleichzeitig die humorale Abwehr.

Diese konträren Zytokinmilieus spielen in der Pathogenese der Schilddrüsenautoimmunität eine entscheidende Rolle, da sich Hashimoto Thyreoiditis und Morbus Basedow in jeweils gegensätzlichen Zytokinmilieus entwickeln. Unklar ist noch, wie stark die Gemeinsamkeiten oder Unterschiede in der Pathogenese dieser beiden häufigsten Schilddrüsen-autoimmunerkrankungen sind.

1.4.3) Pathomechanismus der Hashimoto Thyreoiditis

Hashimoto Thyreoiditis zeichnet sich durch das Vorliegen von Antikörpern gegen Thyroidperoxidase und Thyroglobulin aus. Histomorphologisch liegt eine starke inflammatorische Lymphozyten-Infiltration vor, die Schilddrüsenparenchym verdrängt und schließlich zu Fibrose und Organdestruktion führt. Eine solche Destruktion kann durch Phagozytose, Perforin-induzierte Zell-Lyse oder durch Apoptose ausgelöst werden. In den Arealen, in denen die intakten follikulären Zellen den Lymphozyten in der Anzahl unterlegen sind, weisen die Thyreozyten Merkmale für Apoptose auf⁹². Auf welchen Mechanismen diese Apoptose-Induktion beruhen kann, wird im Folgenden erörtert.

In der Pathogenese der antithyreoidalen Immunantwort wird ein genetischer Hintergrund postuliert (siehe 1.5.3), auf dessen Basis es durch exogene Faktoren (z.B. Nikotin-Konsum⁶⁴ oder Iodaufnahme⁶³) zu einer Aktivierung spezifisch gegen Schilddrüsen-Antigene gerichteter T-Helfer-Zellen kommt. Der initiale Schritt besteht in einer erhöhten intrathyreoidalen Anzahl antigenpräsentierender Zellen⁹³, die dann mit Lymphozyten interagieren und bei einer Fehlfunktion der peripheren Toleranz zu einer Aktivierung antigen-spezifischer T-Lymphozyten führen kann.

So entsteht das charakteristische histologische Bild der HT mit CD4-, CD8-, B-, Plasma-Zellen und Makrophagen, evtl. mit Formation ektooper Keimzentren.

In zwei konkurrierenden Theorien werden die Präsentation echter zelleigener Proteine beziehungsweise das *molecular mimicry* –auch trotz des bisher fehlenden Nachweises einer initialen viralen Infektion⁹⁴– als Auslöser der Aktivierung postuliert. Im Tiermodell der autoimmunen Thyreoiditis exprimieren Thyreozyten aberrantes MHC II, so daß sie Ziel für CD4 (T_H) und CD8 Zellen(T_C) werden können⁹⁴.

Entsprechend konnte in T-Zell-Linien und CD8-Klonen bei Patienten mit HT eine spezifische Aktivität gegen autologe Schilddrüsen-Zellen gezeigt werden, und deren Serumspiegel korrelierten signifikant mit der Schwere der Erkrankung⁹⁵. Bisher ist nicht gänzlich geklärt, inwieweit zytotoxische T-Lymphozyten an der Schilddrüsendestruktion in vivo durch Aktivierung von Todes-Rezeptoren und durch Freisetzung zytotoxischer Mediatoren aus intrazellulären Granula beteiligt sind. Was die klinische Ausprägung der Erkrankung betrifft, scheint die Nekrose von geringerer Relevanz als kontrollierte apoptotische Prozesse zu sein⁹⁶.

Bei den infiltrierenden Lymphozyten handelt es sich desweiteren um T_H-Zellen, die B-Lymphozyten dazu stimulieren, Antikörper gegen thyreoidale Proteine zu produzieren. Diese Antikörper richten sich gegen Thyreoidperoxidase (TPO), Thyreoglobulin, Kolloid-Antigen oder Schilddrüsenhormone. Die Rolle der Auto-Antikörper im klinischen Bild ist noch nicht eindeutig geklärt. Ihre Beteiligung wurde bereits 1977 postuliert, da experimentell die Anhäufung von Vorstufen des Membran-Angriffs-Komplexes des Komplementsystems rund um Schilddrüsen-Follikel beobachtet wurde. Anti-TPO-Antikörper haben die Fähigkeit, Komplement zu binden, und man nahm daher an, daß sie die Antikörper-abhängige Zytotoxizität gegen Thyreozyten auslösen. Darüber hinaus können sie die Freisetzung von PGE₂, IL-1 und IL-6 auslösen. Da die Anwesenheit an sich und auch die Titer der Antikörper in HT nur gering mit dem Ausmaß der Schilddrüsen-Destruktion korrelieren⁹⁷, geht man heute davon aus, daß ihr Beitrag darin liegt, die Entzündungs-Reaktion zu potenzieren⁹⁸.

Die überwiegende Mehrzahl der T_H-Zellen in Schilddrüsen von Hashimoto-Patienten sind vom Typ T_{H1}. Diese produzieren IL-2, das die weitere Expansion der T-Zellen und die Produktion von T_{H1}-typischer Zytokine fördert. Hierzu gehören IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , die die Apoptose-Empfindlichkeit von Thyreozyten induzieren und in vitro auf Thyreozyten die Expression von CD95 auslösen können⁹⁹. IFN- γ zeigte dabei eine stärkere Potenz, dadurch auch die Apoptose auszulösen, denn es erhöht die Expression der Caspasen-3 und -8, zweier Schlüsselpaprasen des Apoptose-Signalwegs¹⁰⁰, deren Aktivität mit dem Ausmaß der Schilddrüsendestruktion korreliert. Auf diese Weise wird der Fas-Signalweg aktiviert, dessen Signaltransduktor Fas auf Thyreozyten exprimiert wird, im physiologischen Milieu jedoch durch ein hohes intrazelluläres Level an anti-apoptotischen Mediatoren (z.B. Bcl-2) inhibiert ist¹⁰¹. Die verminderte Expression von Bcl-2 korreliert mit dem Ausmaß der Schilddrüsendestruktion⁸⁵. Ohne das spezifische Zytokin-Milieu scheint die Apoptose nicht statt zu finden. So wurde z.B. in Schilddrüsen von Mäusen, in denen ektoatisch CD178 exprimiert wurde, keine auto- oder parakrine Thyreozyten-Destruktion nachgewiesen¹⁰².

Infiltrierende T-Lymphozyten wiederum exprimieren FasL, aber vergleichsweise hohe Bcl-2-Level, die vor apoptotischem Zelluntergang schützen.

Da in Hashimoto-Schilddrüsengewebe auch FasL exprimiert ist, stellt die autokrine oder parakrine Apoptose-Induktion durch Wechselwirkungen von Rezeptoren benachbarter Zellmembranen eine weitere Möglichkeit der Gewebsdestruktion dar¹⁰³.

Zusammenfassend basiert die Apoptose-Induktion im Rahmen der Hashimoto Thyreoiditis also auf der gesteigerten Expression von Fas und reduzierten Bcl-2-Level in Thyreozyten, während infiltrierende Lymphozyten durch protektive antiapoptotische Signale vor dem programmierten Zelltod geschützt sind.

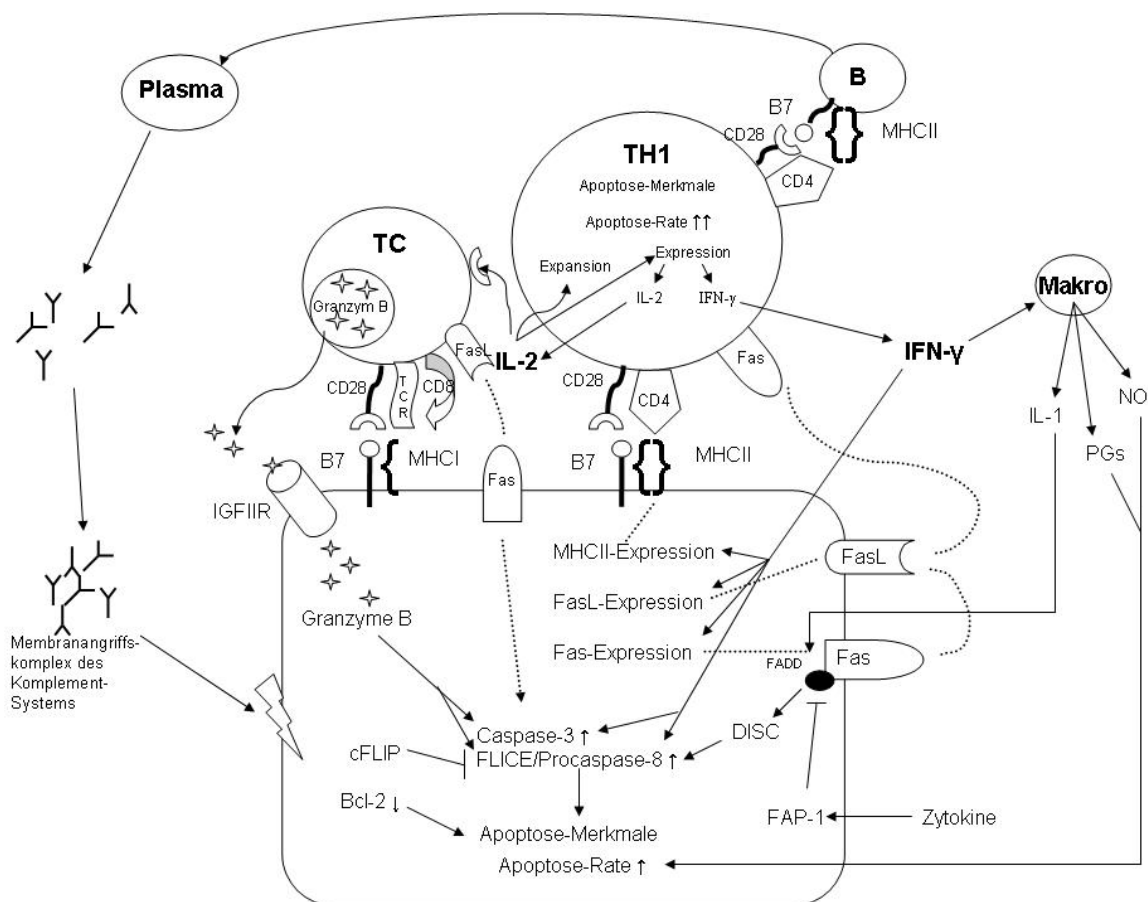


Abbildung 2:
Schematische Darstellung der lymphozytären Infiltration bei Hashimoto Thyreoiditis

1.4.4) Pathomechanismus des Morbus Basedow

Im Gegensatz zur Hashimoto Thyreoiditis ist Morbus Basedow (Graves' Disease, GD) gekennzeichnet durch eine Hyperplasie der Thyreozyten mit einer resultierenden Hyperthyreose. Der zu Grunde liegende Pathomechanismus ist die Aktivierung schilddrüsenpezifischer CD4-Zellen, die autoreaktive B-Lymphozyten rekrutieren und zu einer lokalen Produktion monoklonaler Autoantikörper mit Stimulation des TSH-Rezeptors führen¹⁰⁴. Schilddrüsen von Patienten mit Morbus Basedow sind histologisch charakterisiert durch folliculäre Hyperplasie mit einer eher fokalen Infiltration durch Lymphozyten und die gelegentliche Ausbildung von Keimzentren. Das Ausmaß der Lymphozyteninfiltration und die Apoptose-Rate der Thyreozyten sind im Vergleich zu HT jedoch deutlich geringer¹⁰⁵.

Auch hier sind die Expression von Fas und FasL auf Thyreozyten gesteigert, jedoch sind diese aufgrund einer analog erhöhten Expression von Bcl und c-Flip (*caspase-8 inhibitory protein*) Apoptose-resistent. Dies kann in Zusammenhang stehen mit der Prävalenz der Aktivierung von T_{H2}-Lymphozyten, da von ihnen IL-4 und -10 sezerniert werden, die antiapoptotische Signale (Bcl-2) induzieren und im Mausmodell die autoimmune Destruktion von Schilddrüsenzellen verhindern können¹⁰⁶. Darüber hinaus wird auf diesem Weg die Aktivierung von T_{H1}-Lymphozyten und zytotoxischen CD8-Zellen supprimiert und die humorale Antwort durch Bildung weiterer Autoantikörper gefördert.

Es resultiert ein T_{H2}-spezifisches Zytokinmilieu, das die Apoptose der infiltrierenden Lymphozyten durch eine vermehrte Präsentation von FasL auf Thyreozyten begünstigt. Die funktionelle Relevanz dieser Signaltransduktion wird belegt durch die Beobachtung, dass eine Behandlung mit Thionamiden die FasL-Expression zusätzlich steigert und die Zahl der infiltrierenden Lymphozyten und der produzierten Autoantikörper reduziert¹⁰⁷.

So zeichnen sich autoimmune Schilddrüsenerkrankungen durch einen durchaus konträren Phänotyp aus, der jedoch eine gemeinsame pathogenetische Grundlage in der Apoptose-Induktion durch den Fas/FasL-Signalweg findet. Eine Übersicht über die Regulation der Rezeptor-/ Liganden-Expression und die vorliegenden Zytokinmilieus bietet folgende Tabelle.

Parameter	Hashimoto Thyreoiditis	Morbus Basedow
Ko-Stimulatoren	B7-1	B7-2
CD4+ Subpopulation	TH1-Prädominanz	TH2-Prädominanz
Zytokinprofil	IL-2, TNF- α , IFN- γ	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10
Thyreozyten	\uparrow Fas, \downarrow Bcl-2, \downarrow sFas, \uparrow TRAIL	\downarrow Fas, \uparrow FasL, \uparrow Bcl-2, \uparrow sFas, \uparrow TRAIL
Lymphozyten-Infiltrat	+++	+
Apoptoserate der Thyreozyten	+++	+

Tabelle 3:
Phänotypische Charakteristika von Hashimoto Thyreoiditis und Morbus Basedow
 Nach: Fountoulakis S et al; Clin Endocrinol 2004; 60(4): 397-409

1.5) Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in der Analyse genetisch bedingter Erkrankungen

1.5.1) Bedeutung der SNPs im menschlichen Genom

Während 99,9% des humanen Genoms bei allen Menschen identisch ist, bestehen in den verbleibenden 0,1% Unterschiede in der Sequenz, die für die Ausprägung der verschiedenen Phänotypen verantwortlich sind. Führen diese Sequenzvarianten zu der Expression eines veränderten oder defekten Genprodukts, spricht man von Mutationen, die für die meisten der klassischen, nach den Mendel'schen Regeln vererbten Erkrankungen verantwortlich sind.

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) hingegen sind definiert als Austausch eines einzelnen Basenpaares an einer bestimmten Stelle des Genoms, meist außerhalb kodierender Gensequenzen und daher ohne strukturelle oder funktionelle Bedeutung. Jedoch werden sie auch in regulatorischen Regionen gefunden, die die Expression benachbarter Gene beeinflussen können. Sie treten etwa alle 300 Basenpaare auf, und Ihre Zahl wird daher auf annähernd 10 Millionen geschätzt. SNPs gelten in der Analyse des Genoms als Orientierungspunkte, die die Lokalisation kodierender Gene markieren oder zu Assoziationsanalysen genutzt werden können. Ein weitaus geringerer Anteil von etwa 200.000 SNPs, genannt *coding SNPs* (cSNPs), findet sich direkt in proteinkodierenden Regionen und könnte daher einen direkten Einfluß auf die Genfunktion und somit auf Eigenschaften wie die Metabolisierung von Pharmaka oder die Empfänglichkeit für definierte Erkrankungen haben.

Im Rahmen des humanen Genomprojekts wurde mit Hilfe verschiedenster Techniken (PCR, Microarrays, Massenspektrometrie) bereits eine große Zahl der SNPs identifiziert und katalogisiert, die nun zu Analysen auf Assoziation mit definierten Phänotypen zur Verfügung stehen. Da jedoch diese Detektionstechniken entweder äußerst zeit- oder materialaufwendig sind und die Genotypisierung eines Individuums auf alle 10 Millionen SNPs eines ungerechtfertigt großen Einsatzes bedürfte, wird vermehrt versucht, durch die Zuhilfenahme statistischer Methoden die Aussagekraft einer geringeren Anzahl an SNPs zu erhöhen. Dabei werden mehrere SNPs zusammengefasst und Haplotypen definiert, die dann den Assoziationsanalysen zugeführt werden. Auf diesem Weg könnte theoretisch bereits die Analyse von 500.000 SNPs ausreichen, um den Genotypen eines Individuums zu bestimmen; eine verlässliche Einschätzung der benötigten Anzahl für eine aussagekräftige Analyse ist jedoch noch umstritten.

SNPs, die in räumlicher Nähe –meist etwa im Abstand von etwa 40 kb, selten auch über 1,000 kb entfernt– auf dem Genom liegen, werden oft nicht unabhängig voneinander vererbt, sondern mit einer Kopplung, das durch ein *linkage disequilibrium* bestimmt ist. Diese natürlichen Haplotypen müssen vor der Bildung künstlicher Haplotypen identifiziert werden, da ihre statistische Auswertung keinen weiteren Informationsgehalt erwarten läßt. Seit Oktober 2002 werden durch das *HaplotypeMap-Project*, einer Kooperation mehrerer internationaler Arbeitsgruppen im Rahmen des *Human Genome Research Projects*, statistisch wichtige Haplotypen definiert und stellen so ein Hilfsmittel für ein effizientes Screening auf SNPs zur Verfügung. Die Bedeutung der SNPs in der Genotypisierung auf hereditäre Erkrankungen wird dadurch weiter steigen.

1.5.2) Assoziationsanalysen

Bei der Identifikation genetischer Marker für Erkrankungen mit einem komplexen genetischen Hintergrund gestaltet sich die Suche nach den Einzelfaktoren oft als schwierig, da die einzelnen Loci miteinander interagieren und einen unterschiedlich starken Einfluß auf das Gesamtrisiko nehmen können. Es gibt prinzipiell zwei Methoden, um den Einfluß eines Gens oder einer Genregion auf die Pathogenese einer hereditären Erkrankung zu bestimmen.

Zum Einen durch so genanntes *linkage scanning*, eine Methode, bei der recht unspezifisch das gesamte Genom nach weiträumig verteilten Polymorphismen (meist repeats) gescreent und auf eine statistische Kopplung mit der Erkrankung untersucht wird. Besonders im Bereich des Typ I Diabetes mellitus sind auf diese Weise große Fortschritte erzielt worden.

Die zweite Möglichkeit besteht in der Untersuchung bestimmter Genloci im Rahmen so genannter *candidate gene studies*. Dabei werden spezifische Polymorphismen (meist cSNPs) in Genen untersucht, von deren Funktionalität man eine Relevanz in der Pathogenese annimmt.

Dabei stehen wiederum zwei methodische Möglichkeiten zur Verfügung: Fall-Kontroll-Untersuchungen, bei denen die Allelfrequenz eines Patientenkollektivs mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen wird, und Familienstudien, bei denen man die Transmission an erkrankte Kinder untersucht und die nicht transmittierten Allele als interne Kontrollgruppe nutzt. Fall-Kontroll-Untersuchungen sind zwar in der Rekrutierung weniger aufwändig, bergen aber die Gefahr einer inadäquaten Randomisierung. Bei Familienstudien sind die benötigten Fallzahlen vergleichsweise schwierig zu rekrutieren –besonders, da in die Analysen nur Familien eingehen, bei denen beide Eltern für den untersuchten Polymorphismus heterozygot sind–, allerdings sind diese dann sensitiver in ihrer Aussage. Durch Bildung von Subgruppen, nach Geschlecht oder dem Auftreten weiterer genetischer Prädispositionierung, kann die Sensitivität für Effekte, die nur in bestimmten Populationen wirken, weiter erhöht werden.

1.5.3) Genetische Risikomarker autoimmuner Schilddrüsenerkrankungen

Bereits 1886 wurde zum ersten Mal über die Beobachtung einer familiären Häufung einer der autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen, des Morbus Basedow, berichtet.

Während der vergangenen Jahre wurden in zahlreichen Studien verschiedene genetische Loci auf eine Assoziation mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen untersucht.

Um den genetischen Einfluß für das Auftreten der Erkrankung zu validieren wurde anhand einer groß angelegten Zwillingsstudie mit Hilfe eines statistischen Modells ermittelt, daß 79% der Prädisposition für GD durch genetische Faktoren vermittelt werden, während der Beitrag exogener und humoraler Faktoren bei 21% liegt¹⁰⁸.

Bei den exogenen Faktoren sind Rauchen, vulnerable psychosoziale Phasen und hormonelle Faktoren von besonderer Bedeutung. Vor allem auf einen Einfluß der Sexualhormone gibt es zahlreiche Hinweise: Das bevorzugte Auftreten beim weiblichen Geschlecht⁶⁰, die Progression des Morbus Basedow während/ nach der Schwangerschaft und die Ergebnisse aus Tiermodellen, in denen eine Beeinflussung autoimmuner Schilddrüsenerkrankung durch Eingriffe in die Sexualhormon-Spiegel belegt wurde¹⁰⁹.

Der grundsätzliche Nachweis einer genetischen Komponente wurde durch zwei große dänische Zwillingsstudien belegt. Eine Untersuchung an etwa 9000 Zwillingspaaren ergab für Morbus Basedow eine Konkordanz von 35% in monozygoten Zwillingen im Vergleich zu 3% bei dizygoten Zwillingen und für autoimmune Hypothyreose (atrophische und strumatoide Form) eine 55%ige Konkordanz bei eineiigen Zwillingspaaren, während zweieiige Paare keine Konkordanz zeigten.

Aufgrund der bisherigen Daten geht man davon aus, daß die genetische Prädisposition durch eine Reihe miteinander interagierender Suszeptibilitäts-Allele innerhalb verschiedener Gene vermittelt wird.

Bei Patienten, die bereits an einer organspezifischen Autoimmunopathie erkrankt sind, und bei deren Familienmitgliedern liegt ein erhöhtes Risiko vor, auch an einer autoimmunen Thyreopathie zu erkranken¹¹⁰.

Bei der Suche nach prädisponierenden Genen wurden daher zunächst bereits bekannte Risikofaktoren anderer Autoimmunerkrankungen untersucht, die möglicherweise als gemeinsamer genetischer Hintergrund von Autoimmunität wirken könnten.

Die MHC-Region auf Chromosom 6p21 ist eines dieser Kandidatengene. Es ist unterteilt in drei Regionen und kodiert für HLA Klasse I (A, B, C), Klasse II (DR, DQ, DP) und Klasse III (Complement, Hitzeschockproteine, TNF). Für Morbus Basedow konnten mehrere Fall-Kontrollstudien an kaukasischer Bevölkerung durchgeführt werden. Dabei zeigte sich eine schwache Assoziation der HLA-B-Allele¹¹¹, eine starke Assoziation besteht zu dem HLA-DR3-Haplotyp¹¹² mit einem relativen Risiko¹ zwischen 2 und 5¹¹³. Eine starke und von diesen Loci unabhängige Assoziation konnte bei männlichen Kaukasiern auch zum HLA-DQA1*0501 Allel nachgewiesen werden¹¹⁴, auch wenn dieser Zusammenhang umstritten ist¹¹⁵.

Auch einige weitere Gene in der MHC-Region, wie HSP70¹¹⁶ und TNF¹¹⁷, zeigten eine Assoziation mit Morbus Basedow. Da diese aber in einem starken Kopplungsungleichgewicht zueinander stehen, ist eine eindeutige Zuschreibung des Risikos zu bestimmten Genen schwierig.

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen HLA-Allelen und Hashimoto Thyreoiditis zeigte sich nur eine sehr schwache Assoziation zu HLA-DR3, -DR4 und -DR5.

Während Fall-Kontroll-Studien einen Zusammenhang von MHC-Gen-Polymorphismen und autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen nachweisen konnten, bleiben die Ergebnisse aus Familienstudien jedoch bisher uneindeutig. Zwei Studien konnten eine Kopplung zwischen HLA und Morbus Basedow aufzeigen^{118,119}, zwei Scans des gesamten Genoms konnten dies jedoch nicht bestätigen^{120,121}.

Insgesamt muß man also davon ausgehen, daß nur etwa 10-20% des genetischen Risikos für das Auftreten autoimmuner Schilddrüsenerkrankungen durch MHC vermittelt wird¹¹⁹, was verglichen zu den 30-40%, die man bei IDDM annimmt⁴³, einen geringeren Einfluß darstellt.

¹ Mit relativem Risiko bezeichnet man die Wahrscheinlichkeit, daß ein Individuum, das eine bestimmte genetische Ausstattung (z.B. HLA-DR3) besitzt, die betrachtete Krankheit entwickelt. Bezugsgröße dabei ist die Erkrankungswahrscheinlichkeit eines Individuums ohne diese genetische Ausstattung. Das relative Risiko (RR) errechnet sich nach der Formel $RR = (\text{HLA pos. patients} \times \text{HLA neg. controls}) : (\text{HLA neg. patients} \times \text{HLA pos. controls})$.

Table 2. Case control association studies of the HLA gene region with GD and HT

Author/year	Reference	Size of data set (n)	Population	AITD disease	HLA association	Relative risk (RR)
Yanagawa <i>et al.</i> 1993	[33]	169	Caucasian (USA)	GD	HLA-DR3 DQA1*0501	2.46 3.71
Barlow <i>et al.</i> 1996	[34]	187	Caucasian (UK)	GD	HLA-DR3 DQA1*0501	2.7 3.8
Magklabruks <i>et al.</i> 1991	[85]	130	Caucasian (USA)	GD	HLA-DR3 DQB1*0201/3†	3.38 7.39†
Badenhoop <i>et al.</i> 1992	[86]	346	Caucasian (UK & German)	GD	HLA-DR3	2.26
Badenhoop <i>et al.</i> 1995	[87]	542	Caucasians (German & Canadian)	GD	DQA1*0501	2.5
Cuddihy <i>et al.</i> 1996	[35]	218	Caucasian (USA)	GD	HLA-DR3 DQA1*0501†	3.5 1.8†
Heward <i>et al.</i> 1998	[39]	592	Caucasian (UK)	GD	DRB1*0304-DQB1*02-DQA1*0501	2.72
Yanagawa <i>et al.</i> 1994	[38]	237	Caucasian (USA)	GD	HLA-DR3 DQA1*0501	2.4 3.25
Maciel <i>et al.</i> 2001	[37]	241	Brazilian	GD	DRB1*0301 DQA1*0501	2.8 3.74
Philippou <i>et al.</i> 2001	[88]	221 27 (F)	Greek	GD	DRB1*0301-DQA1*0501	8.4 (M)
Bech <i>et al.</i> 1977	[27]	2053 243	Caucasian (Danish)	GD	HLA-B8† HLA-Dw3	2.8† 3.9
Moens <i>et al.</i> 1978	[40]	262	Caucasians (Canadian)	HT	HLA-DRw3	3.49
Weissel <i>et al.</i> 1980	[89]	197	Caucasian (Austrian)	HT	HLA-DR5	3.16
Tandon <i>et al.</i> 1991	[41]	186	Caucasian (UK)	HT	HLA-DR3-HLA-DQw2	2.23
Jenkins <i>et al.</i> 1992	[90]	143	Caucasian (UK)	HT	DQA1*0402 DRB1 DQB1	2.7 N/S N/S
Wan <i>et al.</i> 1995	[91]	388	Japanese	HT	DRB4*0101 HLA-A2	4.48 2.03
Petrone <i>et al.</i> 2001	[92]	427	Caucasian (Italian)	HT	HLA-DRB1*04-DQB1-0301	4
Hunt <i>et al.</i> 2001	[36]	344	Caucasian (UK)	HT	DRB1*03	4.0

†Result due to LD with HLA-DR3.

Tabelle 4:**Assoziationsstudien zu HLA bei Hashimoto Thyreoiditis und Morbus Basedow in der Übersicht.****Aus: Simmonds, MJ and Gough SCL, Unravelling the genetic complexity of autoimmune thyroid disease: HLA, CTLA-4 and beyond, Clin Exp Immuno 2004; 136:1-10.**

Eine weitere Assoziation besteht zum zytotoxischen T-Lymphozyten Antigen-4 (CTLA-4), einem immunregulatorischen Rezeptor, der auf der Oberfläche aktivierter T-Lymphozyten exprimiert wird, Moleküle der B7-Familie auf antigenpräsentierenden Zellen erkennt, und so ein essentielles kostimulatorisches Signal vermittelt. CTLA-4 verhindert die Produktion von IL-2, hält die Proliferation aktivierter T-Zellen auf, induziert möglicherweise deren Apoptose und gilt damit als Schlüsselinhibitor der T-Zell-Aktivierung.

Das CTLA-4 Gen ist auf Chromosom 2q33 lokalisiert und beinhaltet mehrere Polymorphismen. Funktionell relevant ist ein A-zu-G SNP in Exon 1, der zu einem Austausch von Threonin gegen Alanin an Aminosäureposition 17 führt. Der GG-Genotyp ist verbunden mit einer erhöhten T-Zell-Proliferation nach Stimulation und einer verstärkten Expression von

CTLA-4 auf der Lymphozyten-Oberfläche¹²² und ist assoziiert mit dem Auftreten von Morbus Basedow¹²³. Eine britische Familienstudie bestätigte eine verstärkte Transmission des G-Allels¹²⁴. Ein weiterer Polymorphismus des CTLA-4-Gens ist ein Mikrosatellitenmarker (AT-Repeat) in der untranslatierten Region von Exon 4. Patienten mit langen Allelformen haben höhere IL-2 Serumlevel und eine relative Hyperaktivität der T-Zellen, möglicherweise aufgrund einer geringeren Stabilität des mRNA Transkripts¹²⁵. Das Allel der 106 *mobility unit* tritt bei Morbus Basedow sowohl in einer Fall-Kontroll-Studie¹²⁵ als auch im Vergleich von Patienten mit deren gesunden Geschwister¹¹⁹ signifikant häufiger auf.

Die Untersuchungen an Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis wurden bisher nur mit relativ geringen Fallzahlen durchgeführt, weshalb die Aussage über eine Assoziation des CTLA4 in diesen Fällen gering ist. In einer gepoolten Analyse von vier veröffentlichten Studien ergab sich eine deutlich signifikante Assoziation des G-Allels des Exon-SNPs¹²⁶. Allerdings trat hier auch eine erhebliche Varianz in der Allelverteilung der Kontrollindividuen der verschiedenen Populationen auf, die Frequenzen des G-Allels lagen zwischen 31-36% bei Kaukasiern und 63-68% bei Asiaten.

Da für CTLA-4 auch im Zusammenhang mit anderen Autoimmunerkrankungen eine Assoziation gezeigt wurde (IDDM, Morbus Addison, MS, RA, SLE) wird es mittlerweile als genetischer Risikofaktor für Autoimmunität im Allgemeinen gewertet.

Table 3. Case control association studies of the four originally investigated CTLA-4 SNPs within GD and HT datasets of differing ethnic origin

Author/year	Reference	Size of data set (n)	Population	AITD disease	Relative risk (RR)
<i>CTLA-4(AT)n</i>					
Yanagawa <i>et al.</i> 1995	[46]	218	Caucasians (USA)	GD	2.8
Kotsa <i>et al.</i> 1997	[93]	203	Caucasian (UK)	GD	2.1
		135	Caucasian (UK)	HT	2.2
Petrone <i>et al.</i> 2001	[92]	427	Caucasian (Italian)	HT	N/S
<i>CTLA-4(49)A/G</i>					
Nistico <i>et al.</i> 1996	[47]	171	Hong Kong Chinese	GD	1.7
Donner <i>et al.</i> 1997	[94]	630	Caucasian (German & Canadian)	GD	1.6
Donner <i>et al.</i> 1997	[95]	539	Caucasian (German & Canadian)	HT	1.6
Djilali-Saiah <i>et al.</i> 1998	[96]	173	Caucasian (French)	GD	N/S
Heward <i>et al.</i> 1999	[48]	743	Caucasian (UK)	GD	1.58
Vaidya <i>et al.</i> 1999	[22]	286	Caucasian (UK)	GD	1.8
Buzzetti <i>et al.</i> 1999	[97]	336	Caucasian (Italian)	GD	1.8
Villanueva <i>et al.</i> 2000	[98]	258	Caucasians (USA)	GD	1.6
Allahabadia <i>et al.</i> 2001	[99]	908	Caucasian (UK)	GD	1.8
Petrone <i>et al.</i> 2001	[92]	427	Caucasian (Italian)	HT	N/S
Nithiyananthan <i>et al.</i> 2002	[100]	532	Caucasian (UK)	HT	1.57
Vaidya <i>et al.</i> 2003		650	Caucasian (UK)	GD	1.65
<i>CTLA-4(-318)C/T</i>					
Heward <i>et al.</i> 1998	[101]	546	Caucasian (UK)	GD	N/S
		180	Hong Kong Chinese	GD	N/S
Braun <i>et al.</i> 1998	[102]	447	Caucasian (UK)	HT	N/S
		298	Caucasian (German & Canadian)	GD	2.22
		237	Caucasian (German & Canadian)	HT	N/S
<i>CTLA-4 (1822) C/T</i>					
Vaidya <i>et al.</i> 2003	[103]	650	Caucasian (UK)	GD	1.64

Tabelle 5

Assoziationsstudien zu CTLA-4 bei Hashimoto Thyreoiditis und Morbus Basedow in der Übersicht.

Aus: Simmonds, MJ and Gough SCL, Unravelling the genetic complexity of autoimmune thyroid disease: HLA, CTLA-4 and beyond, Clin Exp Immuno 2004; 136:1-10.

Die Suche nach weiteren genetischen Risikomarkern konzentriert sich deshalb zunehmend auf Studien an Kandidatengenen, die in der Pathogenese der jeweiligen spezifischen Einzelerkrankung relevant erscheinen. Ebenso wird eine Zunahme in der Sensitivität der Genom-Screenings bezüglich der Detektion einer Kopplung weiterer Genregionen Einblicke in pathogenetisch bisher unbeachtete Zusammenhänge und Rückschlüsse sowohl vom Gen zur Pathogenese als auch reziprok zulassen.

2) Fragestellung

Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen sind komplexe Erkrankungen, die auf einem multifaktoriellen Hintergrund beruhen. Eine Interaktion von Umwelt- und genetischen Faktoren scheint in der Entstehung, Progression und der klinischen Ausprägung der Erkrankung wesentlich zu sein. Eine fehlerhafte Regulation der Immunantwort führt, bedingt durch genetische oder endogene Einflüsse, zu einer überschießenden Stimulierung des Immunsystems und einer spezifischen Immunantwort gegen körpereigene Antigene. Lymphozyten greifen daraufhin Schilddrüsengewebe an und initiieren einen Überlebenskampf der Thyreozyten mit den infiltrierenden Immunozyten, dessen Ausgang über die klinische Manifestation der Erkrankungen entscheidet.

Auch wenn Apoptose in der Embryogenese vieler Zell-Linien und der Aufrechterhaltung der Homöostase vieler Gewebsverbände beteiligt ist, so spielt sie innerhalb des Immunsystems und der autoimmunen Erkrankungen eine besonders entscheidende Rolle.

Wie in der Darstellung der Pathomechanismen von Hashimoto Thyreoiditis und Morbus Basedow (1.4.3 und 1.4.4) ausführlich gezeigt werden konnte, spielt Fas/FasL-vermittelte Apoptose und deren Inhibition durch anti-apoptotische Moleküle der Bcl-Familie eine entscheidende Rolle in der Pathogenese beider Erkrankungen. Die Expression von Genabschnitten, die für diese apoptotischen und antiapoptotischen Moleküle kodieren, ist entscheidend für die Regulation des Gleichgewichts von Überleben und Funktionalität sowohl des Schilddrüsengewebes als auch der infiltrierenden Lymphozyten und bestimmt so die Ausprägung der Inflammation und Schilddrüsenfunktionsstörung.

Aberrationen in Genen, die für pro- oder anti-apoptotische Moleküle kodieren, konnten bereits mit der Pathogenese von Autoimmunität, Immundefizienz und malignen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden⁶⁵.

Fragestellung dieser Arbeit ist daher die Untersuchung einer möglichen Assoziation genetischer Polymorphismen in den Genen einiger relevanter Signaltransduktionsmoleküle der Fas/FasL-vermittelten und Bcl-inhibierten Apoptose mit dem Auftreten autoimmuner Schilddrüsenerkrankungen.

Aus den in 1.5.2) diskutierten Gründen wurde in dieser Arbeit die Familienstudie zur Untersuchung einer möglichen Krankheitsassoziation der Fas-, FasL- und Bcl-2-Polymorphismen gewählt.

3) Individuen, Materialien und Methoden

3.1) Patienten, Familien und Kontrollen

In der Studie wurden Blutproben von 730 Individuen kaukasischen Ursprungs aus 209 Familien mit Schilddrüsen-Autoimmunerkrankungen untersucht, die in der endokrinologischen Ambulanz der Klinik der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt und der Pädiatrie der Universität La Sapienza in Rom betreut wurden.

In 100 Familien war mindestens ein Kind an Hashimoto Thyroiditis erkrankt, in 14 dieser Fälle waren zwei Kinder betroffen. Von den 109 Familien mit an Morbus Basedow erkrankten Kindern war in vier Familien ein weiteres Geschwisterkind ebenfalls erkrankt. In 22 HT- sowie 8 GD-Familien wurde die Erkrankung außerdem bei einem Elternteil diagnostiziert.

Das Verhältnis männlicher zu weiblicher Patienten beträgt in der Gruppe der HT-Patienten 1:5, beziehungsweise 1:4,5 in der Gruppe der GD-Patienten.

Klinische Daten sowie der aktuelle Hormonstatus lagen nur in wenigen Fällen vor und konnten deshalb nicht in der Auswertung berücksichtigt werden. Allerdings waren bei jeweils 104 HT- und GD-Patienten die CTLA4 Exon- sowie bei 106 HT-Patienten und 105 GD-Patienten die HLA-DR/ DQ-Genotypen bekannt und konnten zu Subgruppenanalysen herangezogen werden.

Da nicht sämtliche Polymorphismen bei allen Individuen untersucht werden konnten, kommt es zu Überschneidungen der Fallzahlen der einzelnen Subgruppenanalysen.

3.2) Materialien

Eine Übersicht über die verwendeten Geräte, Chemikalien, Lösungen, Oligonukleotide und Enzyme und die jeweilige Bezugsquelle bieten die folgenden alphabetischen Auflistungen.

3.2.1) Geräte und Verbrauchsmaterialien

Artikel und *Bezugsquelle*

Agarose-Gelkammern *Biozym, Hessisch Oldendorf (D); Renner, Dannstadt (D)*

Autoklav *Tuttnauer, Breda (NL)*

Bayol F *Serva, Heidelberg (D)*

Celloshaker *Variospeed Renner, Dannstadt (D)*

Einschweißgerät Polystar 100 GE *Rische und Herfurth, Hamburg (D)*

Electrophoresis Power-Supply *Renner, Dannstadt (D), Biozym, Hessisch Oldendorf (D)*

Electrophoresis Power-Supply EPS 3500 XL *Pharmacia Biotech, Uppsala (S)*

Eppendorf-Cups *Eppendorf, Hamburg (D)*

Falcon-Tubes *Greiner, Frickenhausen (D)*

Folie Köve-Pac, *Gelsenkirchen (D)*
Gefrierschränke (-20°C) *Bosch, Stuttgart (D); AEG, Nürnberg (D)*
Gefrierschrank (-80°C) *Heraeus Sepatech, Hanau (D)*
Gelbond PAG Film FMC, *Rockland (ME, USA)*
Glaspipetten Greiner, *Frickenhausen (D)*
Kühlschränke (+4°C) *Liebherr, Biberach an der Riß (D), Bosch, Stuttgart (D), Kälte Mack, Bischofsheim (D)*
Kühlzentrifuge GPR *Beckman, Glenrothes (UK)*
Leukosilk *Beiersdorf, Hamburg (D)*
Mikrofuge E *Beckman, Glenrothes (UK)*
Mikrowelle Micromat *AEG, Nürnberg (D)*
Multiphor-Gerät *Pharmacia LKB, Uppsala (S)*
Parafilm "M" *American National Can, Chicago (IL, USA)*
PCR-Reaktionsgefäße *Biozym, Hessisch Oldendorf (D)*
pH-Meter pH 522 *WTW, Weilheim (D)*
Pipetten *Eppendorf, Hamburg (D); Roth, Karlsruhe (D)*
Pipettenspitzen *Eppendorf, Hamburg (D), Sarstedt, Nürnbergrecht (D), Starlba GmbH, Ahrensburg (D)*
Pipettierhilfen pi.pump *Glasfirn, (D)*
Plastik-Pasteurpipetten *Roth, Karlsruhe (D)*
Polaroidfilme 667 *Polaroid, Cambridge (MA, USA)*
Polaroid-Sofortbildkamera *Polaroid, Cambridge (MA, USA)*
Präzisionswaage LC 620 S *Sartorius, Göttingen (D)*
Rollenquetscher *Kaiser, (D)*
Schraubverschlußgefäße *Sarstedt, Nürnbergrecht (D)*
Skalpell *Feather, (J)*
Thermocycler PTC-200 *M-Research, Las Vegas (NV, USA)*
UV-Transilluminator (254 nm) *Renner, Dannstadt (D)*
Vortex-Gerät DSG 302 *Heidolph, Kelheim (D)*
Wasserbad SW-20C *Julabo Labortechnik, Seelbach (D)*

3.2.2) Chemikalien

Artikel *Bezugsquelle*

Acrylamid *AppliChem, Darmstadt (D)*
Agarose *Roth, Karlsruhe (D), Biozym, Hessisch Oldendorf (D)*
Agarose high eeO *Serva, Heidelberg (D)*
Ammoniumchlorid *Merck, Darmstadt (D)*
Ammoniumpersulfat *Serva, Heidelberg (D)*
Aqua ad iniectabilia *Braun, Melsungen (D)*
Borsäure *Sigma-Aldrich, Steinheim (D)*
Bromphenolblau *USB, Cleveland (OH, USA)*
BSA *New England Biolabs, Beverly (MA, USA)*
DNA-Molekulargewichtsmarker II, V, VI, VIII, *Boehringer, Mannheim (D)*
dNTPs *Boehringer, Mannheim (D)*
EDTA *Roth, Karlsruhe (D)*
Essigsäure *Merck, Darmstadt (D)*
Ethanol *Apotheke Universitätsklinik, Frankfurt (D)*
Ethidiumbromid 1%, *Roth, Karlsruhe (D)*
Formaldehyd *Merck, Darmstadt (D)*
Formamid *Merck, Darmstadt(D)*
Glycerin *AppliChem, Darmstadt (D)*
Isopropanol *Riedel-de Haen, Seelze (D)*
Kaliumchlorid *Riedel-de Haen, Seelze (D)*
Kaliumhydrogencarbonat *Merck, Darmstadt (D)*
Magnesiumchlorid *Merck, Darmstadt (D)*
Methanol *Riedel-de Haen, Seelze (D)*
Natriumcarbonat *Baker, Deventer (NL)*
Natriumchlorid *Roth, Karlsruhe (D)*
Natriumperchlorat *Sigma-Aldrich, Steinheim (D)*
Repel-Silane *Pharmacia LKB, Uppsala (S)*
Saccharose *Roth, Karlsruhe (D)*
Salpetersäure *Merck, Darmstadt (D)*
Schwefelsäure *Merck, Darmstadt (D)*
SDS *Boehringer, Mannheim (D)*
Silbernitrat *AppliChem, Darmstadt (D)*
SYBR® Green Nucleid Acid Gel Stain *BMA, Rockland (ME, USA)*
TEMED *Sigma-Aldrich, Steinheim (D)*

Tris ultrapure *AppliChem GmbH, Darmstadt (D)*

Tris-HCl *Boehringer, Mannheim (D)*

Triton X-100 *Serva, Heidelberg (D)*

3.2.3) Puffer und Lösungen

Agarosegel-Ansatz (2,5 %)

7,5 g Agarose in 300 ml 1x TAE-Puffer aufkochen,
Färbung mit 30 µl Sybr® Green oder Ethidiumbromid

Agarosegel-Ansatz (3 %)

9 g Agarose in 300 ml 1x TAE-Puffer aufkochen,
Färbung mit 30 µl Sybr® Green oder Ethidiumbromid

Agarosegel-Streifen (5 %)

20 g high eeO Agarose in 400 ml Tris-Borat Puffer aufkochen,
in eine vorgewärmte Wanne gießen, erkalten lassen und in 1-1,5
cm breite Streifen schneiden. Aufbewahrung in mit etwas
Bromphenolblau versetztem Tris-Borat-Puffer über mehrere
Wochen möglich.

dNTP-Mix (10x)

2 mM dATP
2 mM dCTP
2 mM dGTP
2 mM dTTP
Ery-Lysis-Puffer (1x)
0,15 M Ammoniumchlorid
0,01 M Kaliumhydrogencarbonat
0,1 mM EDTA

Ladepuffer (5x)

50 mM Tris-HCl (pH 7,6)
50 mM EDTA
0,5 % SDS
0,1 % Bromphenolblau
40 % Saccharose

Lyse-I-Puffer (1x)

300 mM Saccharose
10 mM Tris (pH 7,5)
5 mM MgCl₂
1 % Triton X-100

Lyse-II-Puffer (1x)

75 mM NaCl
24 mM EDTA

PCR-Puffer (10x)

100 mM Tris-HCl
15 mM MgCl₂
500 mM KCl
auf pH 8,3 einstellen

Polyacrylamidgel-Ansatz (10 %)

10 ml Acrylamid/Bisacrylamid 1:29
6 ml Tris-Sulfat-Puffer (1x)
14 ml Aqua bidest.
210 µl 10 % Ammoniumpersulfat
12 µl TEMED

Polyacrylamidgel-Ansatz (12 %)

12 ml Acrylamid/Bisacrylamid 1:29
6 ml Tris-Sulfat-Puffer (1x)
12 ml Aqua bidest.
210 µl Ammoniumpersulfat
12 µl TEMED

Puffer 2 (10x), Expand Long Template PCR System;
Boehringer, Mannheim (D)

20 mM Tris-HCl
100 mM KCl
22,5 mM MgCl₂
1 mM DTT
0,1 mM EDTA
0,5% Tween® 20
0,5% Nonidet® P40
50% Glycerol
pH 7,5

NEPuffer 2

für Restriktionsendonuklease BstN1 (1x);
New England Biolabs, Beverly (MA, USA)

10 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
50 mM NaCl
1 mM Dithiothreitol
pH 7,9 at 25°C

NEPuffer 3

für Restriktionsendonuklease DraIII (1x);
New England Biolabs, Beverly (MA, USA)

50 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
100 mM NaCl
1 mM Dithiothreitol
pH 7,9 at 25°C

NEPuffer 4

für Restriktionsendonukleasen FokI, Dra I, FspI (1x);
New England Biolabs, Beverly (MA, USA)

20 mM Tris-Acetate
10 mM Mg-Acetate
50 mM Na-Acetate
1 mM Dithiothreitol
pH 7,9 at 25°C

TAE-Puffer (50x)

2 M Tris
0,1 M EDTA (pH 8)
114 ml 1M Eisessig
auf pH 8,5 einstellen
ad 2 l Aqua bidest.

Tris-Borat-Puffer (1x)

62,88 g Tris
8,76 g Borsäure
ad 1 l Aqua bidest.

Tris-Sulfat-Puffer (1x)

2,15 ml H₂SO₄ (96 %)
45,38 g Tris
ad 1 l Aqua bidest.

3.2.4) Oligonukleotide

Alle MWG-Biotech, Ebersberg (D)

Erstellt nach der Gensequenz des humanen Genoms (www.ncbi.nlm.nih.gov):

Fas Promoter	Genbank Zugriffsnummer AC X82279
Fas Exon 7	Genbank Zugriffsnummer AC X82284
FasL Promoter	Genbank Zugriffsnummer AF 027385
FasL Intron02	Genbank Zugriffsnummer AF 027385
FasL EBP	Genbank Zugriffsnummer Z 96050
Bcl2	Genbank Zugriffsnummer NM000633

Fas Promoter forward (19 bp)

5'-CCA AAG GAA TAC TGA AAC C-3'

Fas Promoter reverse (19 bp)

5'-CAC TCA GAG AAA GAC TTG C-3'

Fas Exon 07 forward (21 bp)

5'-TCT CAC ATG CAT TCT ACA AGG-3'

Fas Exon 07 reverse (20 bp)

5'-TTT CAA GGA AAG CTG ATA CC-3'

FasL Promoter forward (20 bp)

5'-CAA TGA AAA TGA ACA CAT TG-3'

FasL Promoter reverse (20 bp)

5'-CCC ACT TTA GAA ATT AGA TC-3'

FasL IVS2nt-124 forward (26 bp)

5'-GCA GTT CAG ACC TAC ATG ATT AGG AT-3'

FasL IVS2nt-124 reverse (25 bp)

5'-CCA GAT ACA GAC CTG TTA AAT GGG C-3'

FasL EBP forward (25 bp)

5'-TTA TGC CTA TAA TCC CAG CTA CTC A-3'

FasL EBP reverse (25 bp)

5'-CGC GTT ATG TTT CGT CGA GAC ACC C-3'

Bcl-2 forward (22 bp)

5'-GAA TGT CTG GAA GCT GAT GGA G-3'

Bcl-2 reverse (27 bp)

5'-CTA CAG TGA TAC ATG TCT TAA GAA GGG-3'

3.2.5) Enzyme

Polymerasen:

Taq-Polymerase

Promega, Madison (WI, USA)

Taq-Gold-Polymerase

Perkin-Elmer, Norwalk (CT, USA)

Restriktionsendonukleasen:

Alle New England Biolabs, Beverly (MA, USA)

Enzym	Puffer, Inkubationstemperatur, Zusätze	Erkennungssequenz
BstN I	NEP 2, 60°C, BSA	5'-CC\\AGG-3' bzw. 5'-CC\\TGG-3' 3'-GGT\\CC-5' 3'-GGA\\CC-5'
Dra I	NEP 4, 37°C	5'-TTT//AAA-3' 3'-AAA//TTT-5'
Dra III	NEP 3, 37°C, BSA	5'-CACNNN//GTG-3' 3'-TGT//CCCACA-5'

Fok I	NEP 4, 37°C	5'-GGATGN(9)\ ______-3' 3'-CCTACN(--13---)\ -5'
Fsp I	NEP 4, 37°C	5'-TGC//GCA-3' 3'-ACG//CGT-5'

3.3) Methoden

Die DNA aller Familienmitglieder wurde auf sieben verschiedene Polymorphismen gescreent, die Genabschnitte für die pro-apoptischen Moleküle Fas und FasLigand sowie das anti-apoptische Molekül Bcl2 kodieren. Im Fas-Gen wurden ein Promoter-Polymorphismus an Position 670 (A-G-Austausch) und ein Polymorphismus in Exon 7 (C-T) untersucht, im FasL-Gen erfolgte die Analyse zweier SNPs in der Promoter-Region (C-T an Position 843 und C-T in der Enhancer Binding Protein-Region (EBP)), außerdem eines Polymorphismus an Position 124 in Intron 02 (IVS2nt-124). Im Bcl-2-Gen wurde ein A-G-Austausch an Position 1955 betrachtet.

Die Gensequenz ist der publizierten Sequenz des humanen Genoms zu entnehmen (www.ncbi.nlm.nih.gov), die Zugriffsnummern wurden unter 3.2.4) angegeben.

Alle untersuchten Polymorphismen weisen einen hohen Heterozygoten-Index auf, daher steht ein hoher Anteil an aussagefähigen Familien im Kollektiv zur Verfügung.

Zunächst soll die Lokalisation der Polymorphismen im Genom dargestellt und die Lage der untersuchten Polymorphismen gekennzeichnet werden.

Die Länge der jeweiligen intronischen und exonischen Abschnitte innerhalb des Gens entspricht maßstabsgetreu deren reeller Länge, die Abstände zwischen den Polymorphismen sind somit relativ zur tatsächlichen Lage.

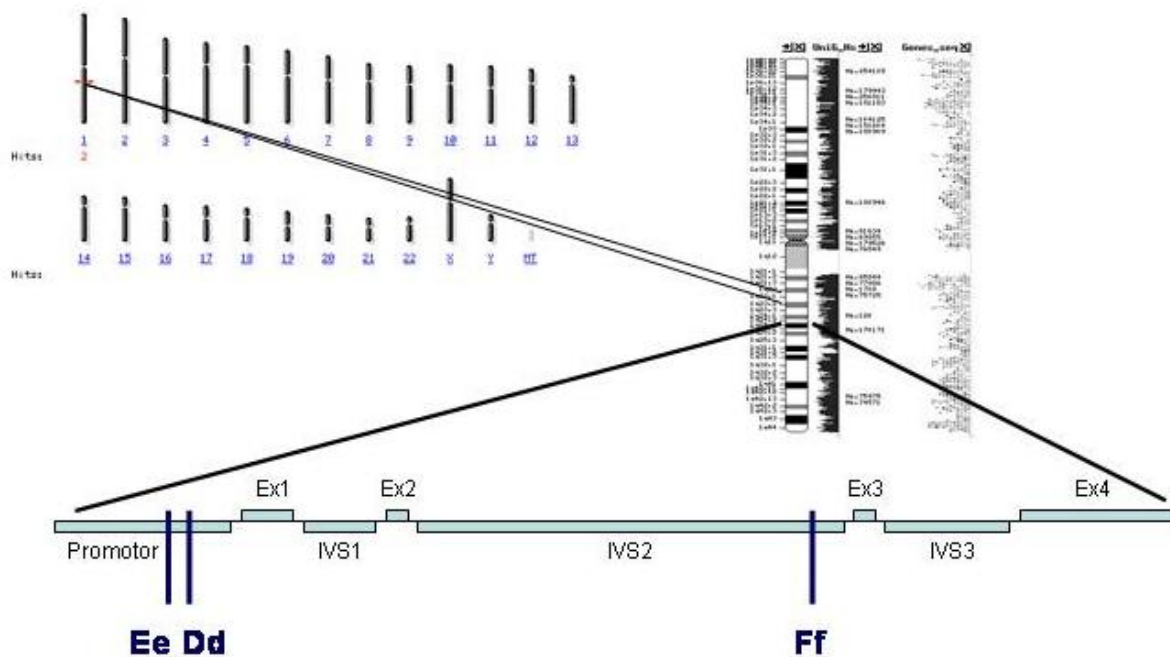


Abbildung 3:
Chromosomale Lokalisation der Polymorphismen des Fas-Gens

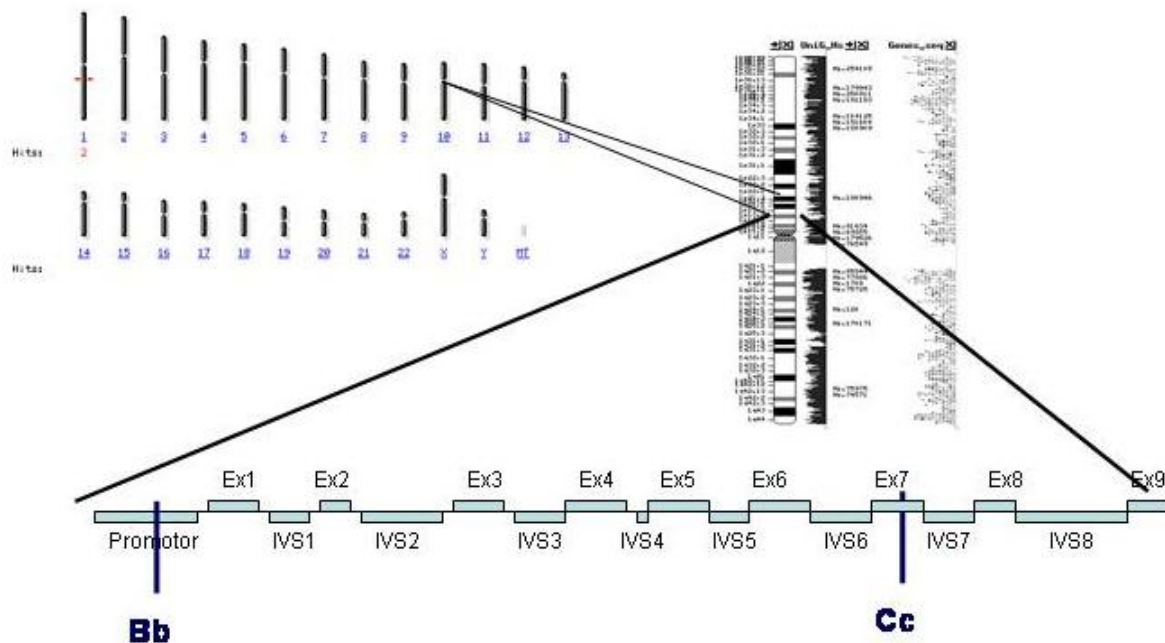


Abbildung 4:
Chromosomale Lokalisation der Polymorphismen des FasL-Gens

3.3.1) DNA-Extraktion

Zur Extraktion der genomischen DNA aus Vollblut werden zunächst alle zellulären Bestandteile sequentiell lysiert, um Proteine und Nukleinsäuren freizusetzen. Anschließend werden die Proteine ausgefällt, da sie die Haltbarkeit der DNA verringern und die Amplifizierung mittels Polymerase-Ketten-Reaktion inhibieren.

Dazu werden 10 ml EDTA-Blut auf zwei 50 ml Falcon-Tubes verteilt, mit je 35ml Lyse-Puffer I versetzt und nach sorgfältigem Mischen 20 Min. bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das entstandene Pellet mit 30 ml Ery-Lysis-Puffer aufgefüllt, gemischt und bei 4.500 U/min erneut 15 Min. zentrifugiert. Nach erneutem Dekantieren werden die zwei Pellets in 4,5 ml Lyse-Puffer II resuspendiert, gepoolt und mit 125 µl 10% SDS sowie 1,1 ml 5M Na-Perchlorat versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf dem Cell-Shaker werden 2 ml gesättigte NaCl zugesetzt und nach kurzem Vortexen erneut 15 Min. bei 2.500 U/Min abzentrifugiert. Die DNA befindet sich nun im Überstand, der mit Hilfe einer Pasteur-Pipette abgenommen und in leere Falcon-Tubes überführt wird. Durch Zusatz von 100 µl 4M NaCl und einem Volumenanteil 100% Isopropanol wird die DNA ausgefällt und als weißliches Gerinnsel sichtbar. Dieses wird mittels einer Glas-Pasteurpipette entnommen, mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. In 300 µl Aqua ad iniectionem wird das Gerinnsel zunächst 24 Stunden bei 4 °C gelagert, um anschließend im 37 °C Wasserbad im Verlauf von weiteren 72 Stunden gelöst zu werden. Nach dem Tiefkühlen auf -20 °C kann diese hochreine DNA mehrere Jahre gelagert werden.

3.3.2) DNA-Konzentrationsbestimmungen

Da die Ausbeute der DNA-Extraktion erheblichen Schwankungen unterliegt, muß in den gewonnenen Proben zunächst die tatsächliche Konzentration an reiner DNA bestimmt werden. Dies erfolgt durch eine gelelektrophoretische Auftrennung der Proben und dem Vergleich mit einem Molekulargewichtsmarker bekannter Konzentration. Dazu werden je 1 µl der Probe bzw. des Marker Nr. II in den Verdünnungen 1:2, 1:5 und 1:10 in 10 µl Aqua dest mit 5 µl Ladepuffer versetzt und auf einem 0,7% Agarosegel bei 100 Volt für etwa 2,5 Stunden elektrophoretisch getrennt. Die Darstellung erfolgt mit Sybr® Green unter UV-Durchleuchtung. Durch direkten Vergleich der Intensität der entstehenden Banden wird die Konzentration der Proben bestimmt. Durch Verdünnung mit Aqua dest wird die gewünschte Arbeitsverdünnung von 100 pmol/ml erreicht.

3.3.3) Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) stellt eine sehr effiziente Methode dar, spezifische Abschnitte der genomischen DNA mit einer Gesamtlänge von maximal 10 kb gezielt zu amplifizieren. Der Ablauf gliedert sich in die drei Schritte: Auftrennung der DNA in Einzelstränge, Anlagerung komplementärer Oligonukleotide (Primer) und Anfertigen einer Kopie durch eine Polymerase.

Die Auftrennung der DNA erfolgt durch eine Temperaturerhöhung auf 94 °C, die anschließende Abkühlung ermöglicht die Anlagerung der Primer an die beiden nun vorliegenden Einzelstränge und markiert als Initiator Beginn und Ende des zu amplifizierenden Gensegments.

Bei dem Design der Primer sind mehrere technische Richtgrößen zu beachten. Sie sollten eine Länge von 20 bis 30 Nukleotiden nicht überschreiten und einen GC-Anteil von etwa 50% enthalten. Ihre 3'-Enden sollten weder inter- noch intramolekular komplementäre Sequenzen enthalten, um die Ausbildung von Primer-Dimeren zu verhindern. Die benötigte Anlagerungstemperatur (T_a) liegt etwa 5-10°C unter der der Schmelztemperatur (T_m) der Primer und berechnet sich aus der Anzahl der zu bildenden Wasserstoffbrücken, also der Länge und der Nukleotid-Zusammensetzung, nach folgender Formel:

$$T_a = T_m - 10^\circ\text{C} = [n(A+T) \times 2^\circ\text{C} + n(C+G) \times 4^\circ\text{C}] - 10^\circ\text{C}$$

Für Primerlängen oberhalb von 20 bp ist diese Formel allerdings zu ungenau. In diesen Fällen wird T_a zur Ausgangstemperatur zur Optimierung des Programms. Um die Spezifität der PCR zu sichern, sollten sich die Anlagerungstemperaturen der beiden Primer nicht um mehr als 2 °C unterscheiden, da eine zu niedrige Temperatur während der Anlagerungsphase eine unspezifische Bindung an nicht-komplementäre Abschnitte der DNA ermöglicht und eine zu hohe Temperatur eine vollständige Bindung verhindert. Optimale Anlagerungstemperaturen liegen zwischen 45 und 65 °C.

Im nächsten Schritt beginnt die DNA-Polymerase bei einer Temperatur von ca. 72°C ausgehend von den Primern mit der Synthese komplementärer DNA aus desoxyNukleotiden. So wächst die Menge des zu amplifizierenden Abschnitts exponentiell an. Um eine optimale Ausbeute der gesuchten Sequenz zu erzielen, ist eine Wiederholung von 25 bis 30 Zyklen nötig. Bei einer noch längeren Reaktionszeit wird die eingesetzte Enzymmenge zum limitierenden Faktor, die noch dadurch beeinträchtigt wird, daß die DNA-Polymerase durch die zyklische Erhitzung und Abkühlung denaturiert.

Zum Ausschluß von Verunreinigungen oder Primer-Kreuzreaktionen wird in jedem PCR-Ansatz eine Negativkontrolle statt mit DNA mit Aqua dest mitgeführt.

3.3.4) Mutagenically-separated PCR

Mutagenically separated PCR (MS-PCR) ist eine PCR-Methode, die durch Modifizierung der herkömmlichen Technik entsteht. Sie wurde entwickelt, um in einem Reaktionsansatz zwei Varianten eines Polymorphismus nachweisen zu können. Dabei werden Primer konzipiert, die die polymorphe Sequenz enthalten, sich aber in ihrem Molekulargewicht deutlich unterscheiden.

In der Gelelektrophorese sind im heterozygoten Fall dann zwei Banden zu sehen, deren Länge sich um den Gewichtsunterschied der Primer unterscheidet und können deshalb eindeutig dem einen oder anderen Allel zugeordnet werden.

Um eine höhere Trennschärfe zwischen den zwei Varianten eines Polymorphismus zu erreichen, können zusätzliche Basenaustausche an anderer Stelle im Primer dazu genutzt werden, Kreuzreaktionen zwischen beiden Primern zu vermindern¹²⁷. Die neu synthetisierten Nukleinsäurestränge enthalten somit je zur Hälfte die artifiziell erzeugte Basenänderung und geben diese an ihre Tochterstränge weiter. Da mit jedem Replikationszyklus die Anzahl der Einzelstränge exponentiell steigt, sich die Zahl der am Originalstrang produzierten Komplementärstränge allerdings nur linear vermehrt, entstehen nach der Formel

$$N = 2n - (n+1)$$

N Gesamtzahl
n Zahl der Zyklen

nahezu exponentiell mehr „mutierte“ Amplifikate. Die Methode der Einführung einer Basenänderung im Amplifikat durch Mutation des Primers wurde im Fall der FasL-Polymorphismen genutzt, um durch Austausch einer zusätzlichen Base eine Schnittstelle für die Restriktionsendonukleasen Dra III und Fok I zu generieren.

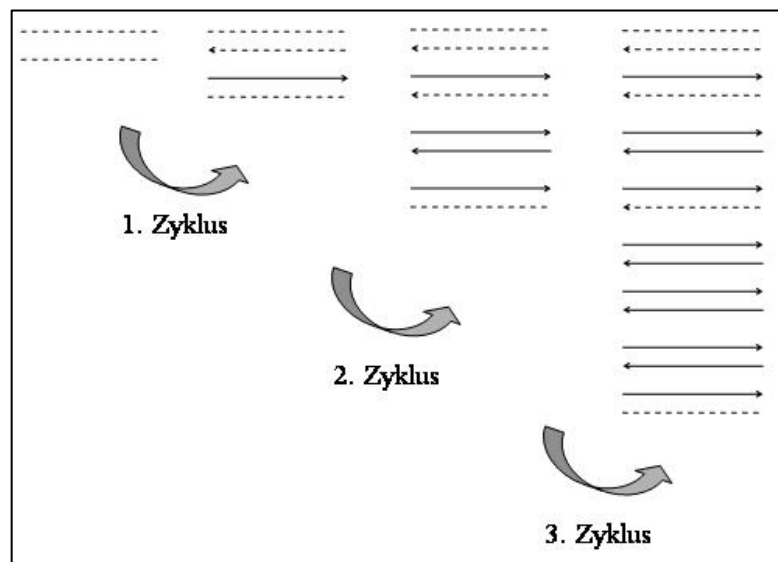


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der MS-PCR mit linearem Anstieg der Zahl der unverändert amplifizierte Stränge und exponentieller Vermehrung der mutierten Stränge.

3.3.5) Reaktionsansätze der PCR

3.3.5.a) Fas Promoter (A-670G)

Reaktionsansatz (25 µl)

2,0 µl Template
2,5 µl Puffer 10x
2,5 µl dNTP's 10x
0,8 µl Fas Promoter forward Primer (=20pmol)
0,8 µl Fas Promoter reverse Primer (=20pmol)
0,25 µl Taq-Polymerase (= 1,25U)
16,15 µl Aqua dest

Reaktionsbedingungen

1. Denaturierung bei 94°C für 3 Min.
2. Denaturierung bei 94°C für 30 Sek.
3. Primeranlagerung bei 55 °C für 30 Sek.
4. Fragmentsynthese bei 72°C für 30 Sek.
5. 29 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4
6. letzter Syntheseschritt bei 72 °C für 10 Min.
7. Kühlung auf 10 °C

Produkt: 474 bp

3.3.5.b) Fas Exon 07

Reaktionsansatz (25 µl)

2,0 µl Template
2,5 µl Puffer 10x
2,5 µl dNTP's 10x
0,8 µl Fas Exon 07 forward Primer (=20pmol)
0,8 µl Fas Exon 07 reverse Primer (=20pmol)
0,25 µl Taq-Polymerase (= 1,25U)
16,15 µl Aqua dest

Reaktionsbedingungen

1. Denaturierung bei 94°C für 3 Min.
2. Denaturierung bei 94°C für 30 Sek.
3. Primeranlagerung bei 56 °C für 30 Sek.
4. Fragmentsynthese bei 72°C für 30 Sek.
5. 29 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4
6. letzter Syntheseschritt bei 72 °C für 10 Min.
7. Kühlung auf 10 °C

Produkt: 178 bp

3.3.5.c) FasL Promoter (C-843T)

Reaktionsansatz (25 µl)

2,0 µl Template
2,5 µl Puffer 10x
2,5 µl dNTP's 10x
0,8 µl FasL Promoter C-843T forward Primer (=20pmol)
0,8 µl FasL Promoter C-843T reverse Primer (=20pmol)
0,25 µl Taq-Polymerase (= 1,25U)
16,15 µl Aqua dest

Reaktionsbedingungen

1. Denaturierung bei 94°C für 3 Min.
2. Denaturierung bei 94°C für 30 Sek.
3. Primeranlagerung bei 45 °C für 30 Sek.
4. Fragmentsynthese bei 72°C für 30 Sek.
5. 29 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4
6. letzter Syntheseschritt bei 72 °C für 10 Min.
7. Kühlung auf 10 °C

Produkt: 114 bp

3.3.5.d) FasL Intron 02 (IVS2nt-124)

Reaktionsansatz (25µl)

2,0 µl Template
2,5 µl Puffer 10x
2,5 µl dNTP's 10x
0,8 µl FasL IVS2nt-124 forward Primer (=20pmol)
0,8 µl FasL IVS2nt-124 reverse Primer (=20pmol)
0,25 µl Taq-Polymerase (= 1,25U)
16,15 µl Aqua dest

Reaktionsbedingungen

1. Denaturierung bei 94°C für 3 Min.
2. Denaturierung bei 94°C für 30 Sek.
3. Primeranlagerung bei 46°C für 30 Sek.
4. Fragmentsynthese bei 72°C für 30 Sek.
5. 29 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4
6. letzter Syntheseschritt bei 72 °C für 10 Min.
7. Kühlung auf 10 °C

Produkt: 230 bp

3.3.5.e) FasL EBP

Reaktionsansatz (25 µl)

2,0 µl Template
2,5 µl Puffer 10x
2,5 µl dNTP's 10x
0,8 µl FasL EBP C-844T forward Primer (=20pmol)
0,8 µl FasL EBP C-844T reverse Primer (=20pmol)
0,25 µl Taq-Polymerase (= 1,25U)
16,15 µl Aqua dest

Reaktionsbedingungen

1. Denaturierung bei 94°C für 3 Min.
2. Denaturierung bei 94°C für 30 Sek.
3. Primeranlagerung bei 56°C für 30 Sek.
4. Fragmentsynthese bei 72°C für 30 Sek.
5. 29 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4
6. letzter Syntheseschritt bei 72 °C für 10 Min.
7. Kühlung auf 10 °C

Produkt: 212 bp

3.3.5.f) Bcl-2 SNP 1955

Reaktionsansatz (25 µl)

2,0 µl Template
2,5 µl Puffer 10x
2,5 µl dNTP's 10x
0,8 µl Bcl-2 1955 forward Primer (=20pmol)
0,8 µl Bcl-2 1955 reverse Primer (=20pmol)
0,25 µl Taq-Polymerase (= 1,25U)
16,15 µl Aqua dest

Reaktionsbedingungen

1. Denaturierung bei 94°C für 3 Min.
2. Denaturierung bei 94°C für 30 Sek.
3. Primeranlagerung bei 57 °C für 30 Sek.
4. Fragmentsynthese bei 72°C für 30 Sek.
5. 29 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4
6. letzter Syntheseschritt bei 72 °C für 10 Min.
7. Kühlung auf 10 °C

Produkt: 154 bp

3.3.5.g) Einsatz der Taq-Gold® Polymerase

Bei einigen wenigen Proben führte die standardisierte Form der PCR aufgrund stärkerer Kontamination der DNA (siehe Abschnitt DNA-Extraktion) nicht zu einem ausreichenden Amplifikationsergebnis. In diesen Fällen wurde die PCR unter Einsatz eines Polymerasegemisches wiederholt.

Reaktionsansatz (25 µl)

- 3,0 µl Template
- 2,5 µl Taq-Gold®-Puffer 10x
- 2,5 µl dNTP's 10x
- 1,5 µl MgCl₂ (25mM)
- 1,2 µl forward Primer (=20pmol)
- 1,2 µl reverse Primer (=20pmol)
- 0,25 µl Taq-Gold®-Polymerase (= 1,25U)
- 12,85 µl Aqua dest

Reaktionsbedingungen

1. Denaturierung bei 94°C für 3 Min.
2. Denaturierung bei 94°C für 30 Sek.
3. Primeranlagerung bei Anlagerungstemperatur für 30 Sek.
4. Fragmentsynthese bei 72°C für 30 Sek.
5. 33 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4
6. letzter Syntheseschritt bei 72 °C für 10 Min.
7. Kühlung auf 10 °C

3.3.6) Restriktionsfragmentlängen-Analyse

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, deren biologische Funktion in der Fragmentierung von eingedrungener Bakteriophagen-DNA besteht. Sie erkennen spezifische DNA-Sequenzen aus maximal acht Basenpaaren, meist in Form von Palindromen (punktsymmetrischen DNA-Sequenzen), trennen die beiden Einzelstränge und spalten das Zucker-Phosphat-Rückgrat der Nukleinsäure. So wird die fremde Phagen-DNA fragmentiert, bevor sie sich in das bakterielle Genom integrieren kann. In der bakterieneigenen DNA sind die entsprechenden Erkennungssequenzen methyliert und werden daher nicht geschnitten. Nur Viren, die aus Bakterien desselben Stammes kommen, besitzen das richtige Methylierungsmuster und können sich weiter vermehren. Die Vermehrung der Viren ist also auf diesen Stamm beschränkt (daher der Terminus Restriktion).

Diese sequenzspezifische Spaltung von Nukleinsäuren wird im Rahmen der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen(RFLP)-Analysen eingesetzt. Dabei macht man sich zu Nutze, daß die zu untersuchenden Polymorphismen durch den Austausch einer einzelnen Base charakterisiert sind. Die Restriktionsenzyme wurden so gewählt, daß sie jeweils nur beim Vorliegen eines der Allele ihre Erkennungssequenz im Amplifikat vorfinden. So wird bei homozygoten Individuen nur eine Bande sichtbar, entweder auf Höhe des ungeschnittenen oder geschnittenen Molekulargewichts, bei heterozygoten Individuen werden zwei Banden dargestellt.

RFLP-Analysen gehören zu den gängigen Methoden der Detektion bestimmter Sequenzen in einer DNA-Probe, auch in der vorliegenden Arbeit wurde der Großteil der Nachweis polymorpher Sequenzen mit Hilfe dieser Methode geführt.

3.3.6.a) Fas Promoter (A-670G)

Reaktionsansatz (20 μ l)

5 μ l PCR-Produkt
0,5 μ l BstN I (= 5U)
2 μ l NEPuffer 2
0,2 μ l BSA
12,55 μ l Aqua dest

Inkubation: 3 h bei 60 °C

Produkte: 210 und 264 bp (A-Allel), 210, 184 und 80 bp (G-Allel)

Elektrophorese: 2,5% Agarose

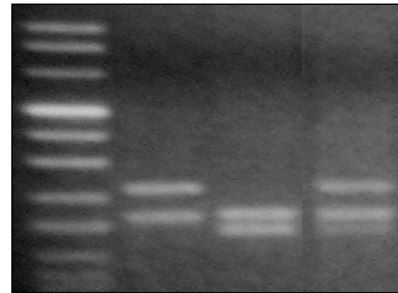


Abbildung 6:
Fas Promoter (A-670G)

3.3.6.b) Fas Exon 07

Reaktionsansatz (20 μ l)

5 μ l PCR-Produkt
0,5 μ l Dra I (= 2,5 U)
2 μ l NEPuffer 4
12,75 μ l Aqua dest

Inkubation: 3 h bei 37 °C

Produkte: 178 bp (C-Allel), 128 und 50 bp (T-Allel)

Elektrophorese: 2,5 % Agarose

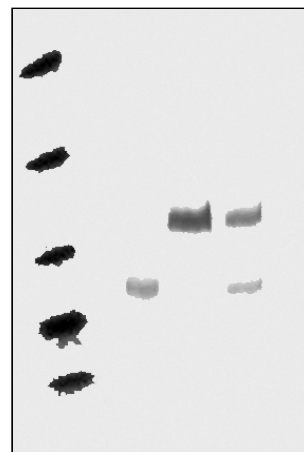


Abbildung 7:
Fas Exon 07

3.3.6.c) FasL Promoter (C-843T)

Reaktionsansatz (20 µl)

5 µl PCR-Produkt
0,25 µl Dra III (= 5U)
2 µl NEPuffer 3
0,2 µl BSA
12,55 µl Aqua dest

Inkubation: 3 h bei 37 °C

Produkte: 114 bp (C-Allel), 98 und 16 bp (T-Allel)

Elektrophorese: 3% Agarose

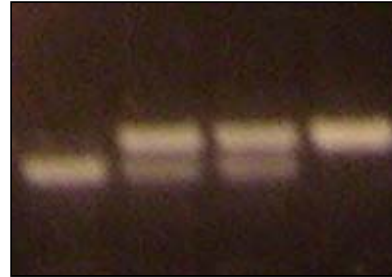


Abbildung 8:
FasL Promoter (C-843T)

3.3.6.d) FasL Intron 02 (IVS2nt-124)

Reaktionsansatz (20 µl)

5 µl PCR-Produkt
5 µl PCR-Produkt
0,25 µl Fok I (= 5U)
2 µl NEPuffer 4
12,75 µl Aqua dest

Inkubation: 3 h bei 37 °C

Produkte: 230 bp (A-Allel), 180 und 50 bp (G-Allel)

Elektrophorese: 2,5% Agarose



Abbildung 9:
FasL Intron 02

3.3.6.e) FasL EBP

Reaktionsansatz (20 µl)

5 µl PCR-Produkt
0,5 µl Fsp I (= 2,5 U)
2 µl NEPuffer 4
12,75 µl Aqua dest

Inkubation: 6 h bei 37 °C

Produkte: 189 bp und 23 bp (C-Allel), 212 bp (T-Allel)

Elektrophorese: 3 % Agarose



Abbildung 10:
FasL EBP

3.3.7) Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Darstellung der PCR-Produkte nach erfolgtem Restriktionsverdau werden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Funktionsweise der Gelelektrophorese beruht darauf, daß DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativen Gesamtladung im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode wandern und von verschiedenen Transportmedien unterschiedlich in dieser Wanderung behindert werden. Die Geschwindigkeit ist durch Größe und Konformation der DNA sowie von der Dichte der Transportmatrix abhängig.

Zur Herstellung eines Agarose-Gels wird die pulverisierte Agarose in TAE-Puffer gelöst, in der Mikrowelle aufgeköcht und nach Abkühlung auf etwa 55 °C mit Sybr® Green oder Ethidiumbromid gefärbt und in eine waagerechte Gelkammer gegossen. Zur Formung der Probestaschen werden Kämme eingesetzt.

Nach Abkühlen des Agarosegels werden die Kämme entfernt, die Taschen mit Molekulargewichtsmarker in der Verdünnung 1:10 in 20 µl Ladepuffer beziehungsweise je 22,5 µl Amplifikat in 5 µl Ladepuffer gefüllt und die Gelkammer an das Spannungsgerät angeschlossen. Bei etwa 100 V erfolgt die Auftrennung der Fragmente in 2 bis 4 Stunden.

Die Darstellung erfolgt durch Fluoreszenz der interkalierenden Farbstoffe bei 254 nm UV-Licht auf dem Transilluminator, eine Sofortbildkamera dokumentiert die Ergebnisse. Durch Vergleich mit dem Molekulargewichtsmarker bekannter Länge können die Längen der detektierten Fragmente interpoliert werden.

Konzentration (%)	Trennbereich (kb)
0,9	0,5 - 7
1,2	0,4 - 6
1,5	0,2 - 4
2,0	0,1 - 3
2,5	0,05 - 2
3,0	0,02 - 1

Abbildung 11: Trennbereiche der Agarose-Gel-Elektrophorese

3.3.8) SSCP-Analyse

Die Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP)-Analyse bietet eine Alternative zu den Möglichkeiten der spezifischen Detektion eines Polymorphismus, da sie eine unspezifische Methode darstellt, den Austausch einer einzelnen Base nachzuweisen.

Einzelstrang-DNA lagert sich unterhalb ihres Schmelzpunkts durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Basen eines Stranges in relativ zuverlässig spezifischen Konformationen zusammen. Der Austausch einer Base, die Deletion oder Integration eines Basenpaares können allerdings eine erhebliche Änderung dieser Konformation hervorrufen und damit das Laufverhalten im elektrischen Feld (siehe 3.3.7) verändern.

Um die Einzelstränge zu erzeugen wird die Doppelstrang-DNA zunächst in Anwesenheit von Formamid denaturiert, bei 95 °C inkubiert und auf einem Polyacrylamid-Gel (PAG, siehe 3.3.9) aufgetrennt. Durch anschließende Sequenzierung der Proben werden die Bandenmuster den einzelnen Genotypen zugeordnet.

So können bisher unbekannte Polymorphismen detektiert oder wie im Falle des Bcl-2-Polymorphismus dieser Arbeit, solche erfasst werden, die aus methodischen Gründen (Fehlen eines passenden Restriktionsenzym) nicht durch eine RFLP-Analyse darstellbar sind. Darüber hinaus ist gerade bei großen Fallzahlen eine SSCP kostengünstiger durchzuführen als eine RFLP.

Ansatz für die SSCP:

1 µl Amplifikat
1,5 µl de-ionisiertes Formamid
10 Minuten bei 95 °C inkubieren
nach Abkühlen auf 10 °C sofort auf das PAG auftragen

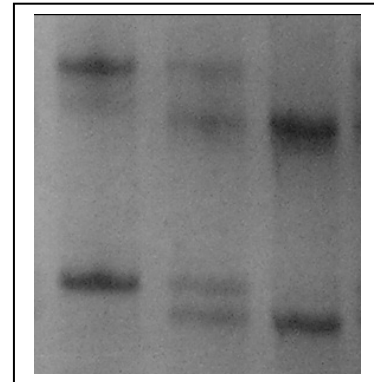


Abbildung 12:
SSCP des Bcl-2 Polymorphismus

AA Aa aa

3.3.9) Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese arbeitet nach demselben Prinzip wie die in 3.3.7 bereits beschriebene Agarose-Gel-Elektrophorese. In der wesentlich engeren Matrix des Polyacrylamids ist jedoch eine präzise Separation auch kleinerer DNA-Fragmente bis 10 bp möglich, und die Methode der Silbernitratfärbung erlaubt bereits den Nachweis geringer DNA-Mengen ab etwa 50 pg.

Zur Erzeugung des Polyacrylamidgels (PAG) wird zwischen zwei Glasplatten ein kapillärer Spalt erzeugt, in dem eine Gelträgerfolie mit dem noch flüssigen Gelansatz beschichtet wird. Auf den Glasplatten wurden zuvor Tesaflex-Stücke von 0,25 mm Dicke aufgebracht, um Probenaschen von 3x4 mm Größe zu erzeugen. Nach etwa 45minütigem Auspolymerisieren kann das fertige Gel mit der Trägerfolie entnommen und auf die Multiphor-Elektrophoreseplatte aufgelegt werden. Jeweils 5 µl der Proben sowie eines 1:10 verdünnten Molekulargewichtsmarkers werden in die Taschen eingebracht, auf der Start- und Zielseite je ein 5%iger Agarose-Streifen als Kontaktgeber und Bromphenolblau-Pufferreservoir aufgesetzt und auf diese die Elektroden angeschlossen. Unter ständiger Kühlung bei 8 °C liegt nun das Feld mit einer Spannung von 1000 V, einer Stromstärke von 12 mA und einer Leistung von 12 W an. Nach etwa 2,5 Stunden ist die Bromphenol-Lauffront weit genug fortgeschritten, um eine ausreichende Trennung der Fragmente zu gewährleisten. Die Trägerfolie mit dem Gel wird zur Färbung und Fixierung in eine Wanne überführt und dort zunächst mit 1%iger Salpetersäure für 3 Minuten inkubiert. Nach zwei 30sekündigen Waschungen mit Aqua dest. wird das Gel in 200 ml 0,4%iger Silbernitratlösung für 20 Minuten unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach weiteren drei Waschvorgängen wird die Färbung in 200 ml 271 mM Natriumcarbonat mit 0,1% Fomaldehyd entwickelt. Nach etwa fünf Minuten sind die DNA-Banden deutlich zu erkennen und das Gel kann in 300 ml 10%iger Essigsäure fixiert werden. Nach Equilibrierung in 300 ml 10%iger Glycerinlösung kann das Gel mehrere Monate eingeschweißt aufbewahrt werden.

Konzentration (%)	Trennbereich (kb)
8,0	60 - 400
10,0	50 - 300
12,0	40 - 200
20,0	10 - 100

Abbildung 13: Trennbereiche der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

3.4) Statistische Auswertung

3.4.1) Indirekte Haplotypisierung

Mit den bisher beschriebenen molekulargenetischen Methoden werden Polymorphismen eines Gens oder eines Chromosoms lediglich in ihrem Genotyp beschrieben. Der eigentliche Erbgang der Haplotypen, also die Konstellation, in der sie vererbt wurden, lässt sich anhand der SNP-Analysen nicht bestimmen. So kann –wie im nebenstehenden Beispiel– der heterozygote Chromosomensatz des Kindes $AaBb$ sowohl in der Konstellation AB/ab also auch Ab/aB vererbt worden sein. Um die vererbten Haplotypen zu ermitteln, müssen die Datensätze weiterer Familienmitglieder in die Auswertung mit einbezogen werden. So ergibt sich –wie in diesem Beispiel– weder aus dem Genotyp der Mutter noch aus dem des Vaters die Möglichkeit, ab als Haplotyp zu vererben, weshalb diese Konstellation auch bei deren gemeinsamen Kind ausgeschlossen werden kann und sich für dieses die Haplotypen Ab/aB ergeben.

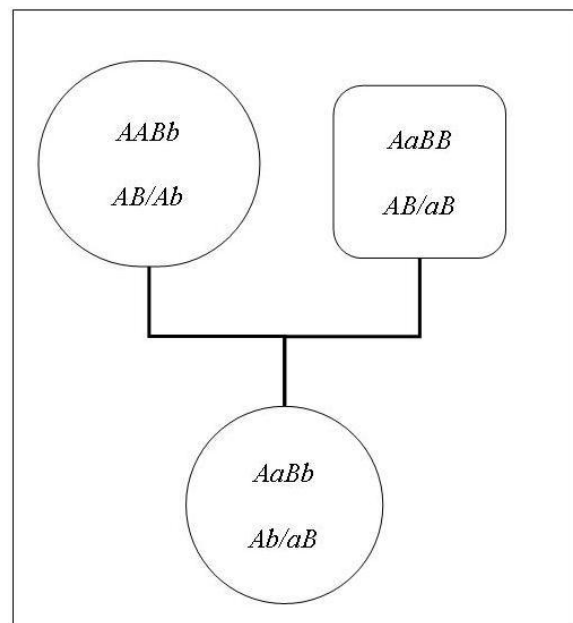


Abbildung 14: Indirekte Haplotypisierung anhand der Stammbaumanalyse

3.4.2) Konditionierung und Subgruppenanalyse

Bei der Analyse genetischer Risikofaktoren sieht man sich im Fall multifaktoriell vererbter Erkrankungen mit der Tatsache konfrontiert, daß einige Faktoren in der Pathogenese einer Erkrankung nur unter bestimmten Bedingungen oder an bestimmten Subgruppen einer Population zu relevanten Veränderungen führt und sich signifikante Unterschiede in der Vererbung dann nur in der entsprechenden Subpopulation nachweisen lassen. Umgekehrt ist

es auch möglich, daß Unterschiede, die im Gesamtkollektiv statistisch nachweisbar sind, bei der Analyse von Subpopulationen nur in einzelnen Gruppen auftreten und allein auf deren Beitrag zurückzuführen sind. Um diese Verzerrungen auszuschalten sind die Bildung von Subgruppen und deren separate Analyse ein zuverlässiges Mittel. Limitierend wirkt hierbei allerdings die Gesamtzahl der untersuchten Proben, da innerhalb der Subgruppen die Zahl der eingeschlossenen Individuen schnell unterhalb einem statistisch sinnvollen Minimum liegt.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Subgruppen untersucht:

Erkrankung: HT vs. GD
 Geschlecht des Patienten: männlich vs. weiblich
 Elterlicher Ursprung: Mutter vs. Vater
 CTLA4-Genotypen: AA vs. AG vs. GG
 HLA DR/DQ-Genotypen: DR2 vs. DR3

3.4.3) Linkage Disequilibrium

Polymorphe Gene, die auf zwei verschiedenen Chromosomen liegen, werden unabhängig voneinander vererbt, die Genotypenhäufigkeit (H_{Gg}) in einer Population läßt sich also durch Multiplikation der Häufigkeiten der Allele ($H_G \times H_g$) errechnen.

Genotyp	AA	Aa	aa
BB	a	b	c
Bb	d	e	f
bb	g	h	i

$$H_A = \frac{(a+d+g) + 0,5x(b+e+h)}{n}$$

$$H_a = 1 - H_A$$

$$H_B = \frac{(a+b+c) + 0,5x(d+e+f)}{n}$$

$$H_b = 1 - H_B$$

Untersucht man jedoch Genorte, die auf demselben Chromosom liegen, ist davon auszugehen, daß sie gemeinsam, also gekoppelt, vererbt werden. Die Wahrscheinlichkeit hierfür sinkt mit zunehmendem Abstand der beiden Loci voneinander, da sich die Wahrscheinlichkeit eines Crossing-overs in dem dazwischen liegenden Teil der DNA erhöht. Dabei überlagern sich die Arme von zwei Nicht-Schwester-Chromatiden und tauschen einen Teil ihres Doppelstrangs aus, „entkoppeln“ also möglicherweise die untersuchten Genorte.

Auch aus verschiedenen anderen Gründen kann die strikte Kopplung unterbrochen und die Wahrscheinlichkeit einer gemeinsamen Vererbung verringert werden. So findet bei funktionellen Unterschieden in den Haplotypen eine natürliche Selektion statt, die einen Haplotypen bevorzugt. Außerdem wirken Gründereffekte, Migration und das evolutionäre Alter des Polymorphismus auf die Allelfrequenz.

Aus diesem Grund wird für benachbarte Gene das Linkage Disequilibrium (D) als Meßgröße der Abweichung von der erwarteten Genotypenhäufigkeit angegeben und repräsentiert somit die Abhängigkeit oder Unabhängigkeit der beiden Loci voneinander an.

Es errechnet sich nach folgender Formel:

$$D_{AB} = \frac{n}{n-1} \times \left[\frac{4 \times a + 2 \times (b+d) + e}{2 \times n} - 2 \times H_A \times H_B \right]$$

Zur Beurteilung der Relevanz des Kopplungsungleichgewichts vergleicht man die Abweichung von Null mit der Standardabweichung (SE).

$$SE(D_{AB}) = \sqrt{\text{Var}(D_{AB})}$$

$$\text{Var}(D_{AB}) = \frac{H_A \times H_a \times H_B \times H_b}{n-1} + \frac{(2 \times H_A - 1) \times (2 \times H_B - 1) \times D_{AB}^2}{2 \times n} + \frac{D_{AB}^2}{n \times (n-1)}$$

Die Bedeutung des Linkage Disequilibriums für die Analyse mehrerer SNPs besteht darin, daß ein ausgeprägtes Linkage Disequilibrium zwischen einzelnen SNPs dazu führt, daß eine Auswertung einer steigenden Zahl von Markern keinen nennenswerten Informationsgewinn erwarten lässt, im Gegenteil sogar die Sensitivität für geringe Tendenzen durch Abnahme der Subgruppengröße und steigende Freiheitsgrade zunichte gemacht werden.

3.4.4) Chi²-Vierfeldertest

Mit Hilfe des Chi²-Vierfeldertests kann im Rahmen von Assoziationsstudien untersucht werden, ob die Verteilung eines Polymorphismus oder anderer Merkmale zweier zu vergleichender Gruppen (Patienten vs. Kontrollen) signifikant voneinander abweicht, oder ob sich die Verteilung innerhalb eines dem Zufall zuzuschreibenden Rahmen bewegt. Dazu werden zwei bezüglich sämtlicher anderer Einflußgrößen möglichst homogene Kollektive betrachtet und die Häufigkeit eines Merkmals mit der Häufigkeit verglichen, die bei gleichmäßiger Verteilung des Merkmals in beiden Gruppen zu erwarten wäre. Je größer die Differenz zwischen diesen beiden Werten, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß sich die Gruppen im untersuchten Merkmal unterscheiden.

Zur Analyse erstellt man eine Vierfeldertafel, in der die Anzahl der beobachteten Fälle dem Auftreten eines Merkmals (Merkmal positiv bzw. negativ) zugeordnet wird und vergleicht diese Werte mit der Tafel, die bei gleichmäßiger Verteilung der Fallzahl über die Felder entstünde.

	MM positiv	MM negativ	Σ
Gruppe A			
Gruppe B			
Σ			

Der Chi²-Wert wird als die Summe der standardisierten Abweichungen aller Felder betrachtet.

$$\text{Chi}^2 = \sum \frac{(n_{\text{Beobachtet}} - n_{\text{Erwartet}})}{n_{\text{Erwartet}}}$$

Für die Anwendung an kleineren Gruppen muß eine Stetigkeitskorrektur der Werte nach Yates erfolgen. Dem so berechneten Chi²-Wert wird rechnerisch oder tabellarisch ein p-Wert zu geordnet, der die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der die beiden Gruppen sich nicht voneinander unterscheiden. In dieser Arbeit wurde die Signifikanzgrenze bei einer Wahrscheinlichkeit von p<0,05 gesetzt.

3.4.5) Transmission Disequilibrium Test (TDT)

Um die Schwierigkeiten bei der Auswahl zweier äußerst homogener Vergleichsgruppen zu umgehen, können Assoziationsanalyse genetischer Polymorphismen nicht nur durch den Vergleich Ihrer Häufigkeit in zwei Gruppen, sondern auch durch die Vererbungshäufigkeiten im Rahmen von Familienstudien untersucht werden. Der Vergleich der Transmission zweier Allele stellt eine wesentlich spezifischere und sensitivere Methode zur Detektion einer möglichen Krankheitsassoziation dar.

Dabei wird zunächst ebenfalls ein Chi²-Test durchgeführt, der die Häufigkeiten der transmittierten (t) und nicht transmittierten (nt) Allele vergleicht und so das *haplotype relative risk* (HRR) errechnet. Die nicht transmittierten Allele dienen hierbei als interne Kontrolle.

Beim Transmission Disequilibrium Text (TDT) wird die Transmission jedoch nur anhand der Familien untersucht, deren Eltern bezüglich des betrachteten Polymorphismus heterozygot sind, da nur bei ihnen eine 50%ige Wahrscheinlichkeit zur Vererbung jedes Allels gegeben ist. Die Abweichung von dieser statistischen Wahrscheinlichkeit wird dann als mögliche Assoziation mit der Erkrankung des Kindes gewertet.

$$\text{Chi}^2 = \sum \frac{(t - nt)^2}{(t + nt)}$$

Auch hier kann Anhand der Ermittlung eines p-Wertes für die Wahrscheinlichkeit, daß die beobachtete Abweichung zufällig entstanden ist, ermittelt werden. Ein p-Wert von <0,05 wird als statistisch signifikant gewertet.

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde im Fall von Fas und FasL ein Erweiterung des TDT, der ETDT durchgeführt (siehe 3.4.6).

3.4.6) Extended Transmission Disequilibrium Test (ETDT)

Der Extended Transmission Disequilibrium Test (ETDT) wurde zur Untersuchung multi-allelischer Marker entwickelt, da die aufeinander folgende Berechnung mehrerer Chi²-Werte auch nach Korrektur entsprechend der Freiheitsgrade nur eine Annäherung an die tatsächliche Wahrscheinlichkeit zulässt und falsch negative Werte liefert.

Bei seiner Berechnung wird jedem Allel ein Parameter (X) zugeordnet, der sich aus dem natürlichen Logarithmus des Verhältnisses einer Vererbungswahrscheinlichkeit zur anderen errechnet:

$$X = \ln \frac{t_A}{t_B}$$

Diese Werte werden mit dem natürlichen Logarithmus der Wahrscheinlichkeit unter der Nullhypothese (Vererbungswahrscheinlichkeit von 50%) verglichen:

$$\text{Chi}^2 = 2 \times (\ln 1 - \ln 0)$$

Zur Detektion möglicher signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Subgruppen wurden die jeweiligen Ergebnisse des ETDT mit einem Freiheitsgrad von (Anzahl Allele -1) nach folgender Formel miteinander verglichen:

$$\text{Chi}^2 = 2 \times [\ln 1(a) + \ln 1(b) - \ln$$

3.4.7) TRANSMIT-Analyse

Die TRANSMIT-Analyse stellt eine Möglichkeit dar, auch die wenigen Familien in die Analysen mit einzubeziehen, bei denen eine Genotypisierung oder die eindeutige Zuordnung der Haplotypen nicht bei allen Familienmitgliedern möglich war. So wird keine Familie aus der Analyse ausgeschlossen und eine mögliche Selektion verhindert.

Dazu wird anhand der Haplotypenfrequenz der Gesamtpopulation eine Wahrscheinlichkeit ermittelt, mit der das entsprechende Familienmitglied einen bestimmten Haplotypen aufweisen wird und dieser als Konstruktionsgrundlage angenommen, auf der dann ein ETDT durchgeführt wird.

Die TRANSMIT-Analyse kann jedoch nur bei entsprechend großer Fallzahl mit ausreichender Sicherheit der Aussage eingesetzt werden. Bei der Analyse der Subgruppen wurde sie in dieser Arbeit deshalb nicht verwendet.

4) Ergebnisse

209 Familien mit Schilddrüsen-Autoimmunerkrankungen wurden untersucht, davon war in 100 Familien mindestens ein Kind an Hashimoto Thyreoiditis (HT) erkrankt, in 14 dieser Fälle waren zwei Kinder betroffen. Von den 109 Familien mit an Morbus Basedow (GD) erkrankten Kindern war in vier Familien ein weiteres Geschwisterkind ebenfalls erkrankt. In 22 HT- sowie 8 GD-Familien wurde die Erkrankung außerdem bei einem Elternteil diagnostiziert.

Die Darstellung der Daten erfolgt der Übersichtlichkeit halber stets nach dem gleichen Schema: Zunächst werden die Ergebnisse der Analysen der Familien mit HT-Patienten, dann die der Patienten mit GD aufgeführt. Innerhalb dieser Abschnitte wird zunächst Fas, dann FasL, dann Bcl-2 behandelt.

4.1) Hashimoto Thyreoiditis

4.1.1) Fas bei Hashimoto Thyreoiditis

Zunächst soll die Vererbung der Fas-Rezeptor-Polymorphismen bei Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis dargestellt werden. Hierbei wird zunächst die Verteilung der einzelnen Allele untersucht, dann erfolgt eine Analyse auf mögliche Kopplung der Allele und anschließend die Analyse eines potentiellen Vererbungsungleichgewichtes bei Patienten, Geschwistern und den verschiedenen Subgruppen (HLA-DQ/-DR-Haplotypen, CTLA4-Genotypen).

In den Tabellen werden zunächst transmittierte gegen nicht-transmittierte Allele aufgeführt, dahinter folgen das Ergebnis des χ^2 -Vierfeldertest mit resultierendem p-Wert und ggfs. das Ergebnis des ETDT. Ist für den ETDT kein Wert angegeben, lag eine unzureichende Fallzahl vor, die die Errechnung eines ETDT nicht ermöglichte.

B = A-Allel des Promoter-Polymorphismus = 210 und 264 bp

b = G-Allel des Promoter-Polymorphismus = 210, 184 und 80 bp

C = C-Allel des Exon7-Polymorphismus = 178 bp

c = T-Allel des Exon7-Polymorphismus = 128 und 50 bp

T = transmittiert

NT = nicht transmittiert

ETDT = Extended Transmission Disequilibrium Test

HaI = Indexpatient mit Hashimoto Thyreoiditis

HaM = Mutter eines Indexpatienten

HaV = Vater eines Indexpatienten

4.1.1.a) Allelverteilung und Kopplungsanalyse (Fas bei Hashimoto Thyreoiditis)

	Ha Index	%	Ha M	%	Ha V	%	HaEltern	%	HaGesamt	%
B	86	55,5	78	55,7	80	53,7	158	54,7	244	55,0
b	69	44,5	62	44,3	69	46,3	131	45,3	200	45,0
Summe	155	100	140	100	149	100	289	100	444	100
C	95	59,7	80	59,3	93	66,0	173	62,7	268	61,6
c	64	40,3	55	40,7	48	34,0	103	37,3	167	38,4
Summe	159	100	135	100	141	100	276	100	435	100

Die Häufigkeit der Polymorphismen B und b ist unter Kindern und Eltern prozentual etwa gleich verteilt (45-55%), eine erhöhte Prävalenz des C-Allels gegenüber des c ist in allen Gruppen zu verzeichnen ($p < 0,05$).

	Ha Index	%	Ha M	%	Ha V	%	HaEltern	%	HaGesamt	%
BC	81	33,6	67	36,2	74	36,1	141	36,2	222	35,2
Bc	49	20,3	35	18,9	32	15,6	67	17,2	116	18,4
bC	61	25,3	41	22,2	59	28,8	100	25,6	161	25,5
bc	50	20,7	42	22,7	40	19,5	82	21,0	132	20,9
Summe	241	100	185	100	205	100	390	100	631	100

Das Allel BC stellt etwa ein Drittel (35,2%) aller Haplotypen. Die Häufigkeit der Allele bC (25,5%), bc (20,9%) und Bc (18,4%) sind etwa gleich verteilt.

Zur Untersuchung einer möglichen Kopplung der Polymorphismen des Fas-Rezeptors wurde das Linkage Disequilibrium berechnet. In diesem Fall weicht es um etwa 5,5 Standardabweichungen von 0 ab ($D_{BC} = 0,10579 \pm 0,01895$) und ist damit als signifikant zu bezeichnen.

4.1.1.b) Vererbung an Patienten (Fas bei Hashimoto Thyreoiditis)

	T	NT	χ^2	p	ETDT
BC	32	28	0,267	0,606	3 df $\chi^2: 0,841$ p: 0,839
Bc	10	14	0,667	0,414	
bC	21	23	0,091	0,763	
bc	25	23	0,083	0,773	
B	35	31	0,242	0,622	
b	31	35	0,242	0,622	
C	28	33	0,410	0,522	
c	33	28	0,410	0,522	

Für keinen der untersuchten Fas-Haplotypen konnte bei der Betrachtung der Indexpatienten mit Hashimoto Thyreoiditis ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht festgestellt werden:

BC 32 von 60mal vererbt ($p=0,606$), Bc 10 von 24mal vererbt ($p=0,414$), bC 21 von 44mal vererbt ($p=0,763$) und bc 25 von 48mal vererbt ($p=0,773$). Auch die isolierte Betrachtung der einzelnen Polymorphismen ergab keine signifikante Abweichung von den erwarteten Werten: Promoter-Polymorphismus Bb ($p=0,622$) und Exon7-Polymorphismus Cc ($p=0,522$). Auch in der Analyse der kombinierten Haplotypen ergab sich keine statistische Signifikanz ($p_{ETDT}=0,839$).

4.1.1.c) Vererbung an Geschwister (Fas bei Hashimoto Thyreoiditis)

	T	NT	χ^2	p	ETDT
BC	15	16	0,032	0,857	3df χ^2 : 0,610 p: 0,894
Bc	6	8	0,286	0,593	
bC	12	12	0,000	1,000	
bc	11	8	0,474	0,491	
B	18	17	0,029	0,866	
b	17	18	0,029	0,866	
C	16	14	0,133	0,715	
c	14	16	0,133	0,715	

Bei der Betrachtung der gesunden Geschwister konnte für keinen der untersuchten Fas-Haplotypen ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht festgestellt werden: BC 15 von 31mal vererbt ($p=0,857$), Bc 6 von 14mal vererbt ($p=0,593$), bC 12 von 24mal vererbt ($p=1,0$) und bc 11 von 19mal vererbt ($p=0,491$). Auch die isolierte Betrachtung der einzelnen Polymorphismen ergab keine signifikante Abweichung von den erwarteten Werten: Promoter-Polymorphismus B/b ($p=0,866$) und Exon7-Polymorphismus C/c ($p=0,715$). Auch in der Analyse der kombinierten Haplotypen ergab sich keine statistische Signifikanz ($p_{ETDT}=0,894$).

Sowohl die Einzelauswertung der Vererbung beider Polymorphismen als auch die Auswertung der Haplotypen ergab somit kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht bei Patienten oder Geschwisterkindern.

4.1.1.d) HLA-DQA 0501 positiv (Fas bei Hashimoto Thyreoiditis)

Eine Subgruppenanalyse auf HLA-Haplotypen konnte bei 98 Patienten mit HT durchgeführt werden, bei denen die HLA-Haplotypen verfügbar waren. Da für verschiedene Genloci unterschiedlich starke Einflüsse auf das Erkrankungsrisiko nachgewiesen werden konnten, wäre der Einfluß anderer genetischer Faktoren in den Gruppen mit dem jeweils niedrigsten HLA-vermittelten Risiko am stärksten nachweisbar. Zur Relevanz der einzelnen HLA- und CTLA4- Hapotypen siehe 1.5.3).

BC	28	30	0,069	0,793	3df χ^2 : 1,752 p: 0,625
Bc	10	15	1,000	0,317	
bC	27	20	1,043	0,307	
bc	23	23	0,000	1,000	
B	32	23	1,473	0,225	
b	23	32	1,473	0,225	
C	21	23	0,091	0,763	
c	23	21	0,091	0,763	

Für keinen der untersuchten Fas-Haplotypen konnte bei der Betrachtung der HLA-DQA 0501-positiven Indexpatienten mit Hashimoto Thyreoiditis ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht festgestellt werden: BC 28 von 58mal vererbt ($p=0,793$), Bc 10 von 25mal vererbt ($p=0,317$), bC 27 von 47mal vererbt ($p=0,307$) und bc 23 von 46mal vererbt ($p=1,0$). Auch die isolierte Betrachtung der einzelnen Polymorphismen ergab keine signifikante Abweichung von den erwarteten Werten: Promoter-Polymorphismus Bb ($p=0,225$) und Exon7-Polymorphismus Cc ($p=0,763$).

Auch in der Analyse der kombinierten Haplotypen ergab sich keine statistische Signifikanz ($p_{ETDT}=0,625$).

4.1.1.e) HLA-DR3 positiv (Fas bei Hashimoto Thyreoiditis)

	T	NT	χ^2	p	ETDT
BC	18	17	0,029	0,866	3df χ^2 : 3,551 p: 0,314
Bc	5	11	2,250	0,134	
bC	20	13	1,485	0,223	
bc	13	15	0,143	0,705	
B	21	13	1,882	0,170	
b	13	21	1,882	0,170	
C	11	16	0,926	0,336	
c	16	11	0,926	0,336	

Unter den HLA-DR3 positiven HT-Patienten konnte kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht festgestellt werden: BC 18 von 35mal vererbt ($p=0,866$), Bc 5 von 16mal vererbt ($p=0,134$), bC 20 von 33mal vererbt ($p=0,223$) und bc 13 von 28mal vererbt ($p=0,143$). Auch die isolierte Betrachtung der einzelnen Polymorphismen ergab keine signifikante Abweichung von den erwarteten Werten: Promoter-Polymorphismus Bb ($p=0,17$) und Exon7-Polymorphismus Cc ($p=0,336$).

Auch in der Analyse der kombinierten Haplotypen ergab sich keine statistische Signifikanz ($p_{ETDT}=0,314$).

4.1.1.f) CTLA4-Subgruppen (Fas bei Hashimoto Thyreoiditis)

Auch durch die Polymorphismen der CTLA4-Haplotypen ist die Vermittlung eines Risikos zur Entwicklung einer Hashimoto Thyreoiditis gezeigt worden (s. 1.5.3). Der CTLA-Genotyp war bei 96 Patienten der untersuchten Population bekannt und konnte zur Subgruppenanalyse herangezogen werden.

AA	T	NT	χ^2	p	ETDT
BC	17	10	1,815	0,178	3df χ^2 : 3,670 p: 0,300
Bc	3	8	2,273	0,132	
bC	12	16	0,571	0,450	
bc	11	9	0,200	0,655	
B	14	15	0,034	0,853	
b	15	14	0,034	0,853	
C	9	13	0,727	0,394	
c	13	9	0,727	0,394	

AG	T	NT	χ^2	p	ETDT
BC	15	18	0,273	0,602	3df χ^2 : 3,663 p: 0,300
Bc	7	8	0,067	0,796	
bC	18	9	3,000	0,083	
bc	8	13	1,190	0,275	
B	14	10	0,667	0,414	
b	10	14	0,667	0,414	
C	11	16	0,926	0,336	
c	16	11	0,926	0,336	

GG	T	NT	χ^2	p	ETDT
BC	2	0	2,000	0,157	---
Bc	0	1	1,000	0,317	
bC	1	1	0,000	1,000	
bc	2	3	0,200	0,655	
B	1	2	0,333	0,564	
b	2	1	0,333	0,564	
C	1	3	1,000	0,317	
c	3	1	1,000	0,317	

In keiner der untersuchten CTLA4-Subgruppen (AA, AG, GG) ergab sich mit p-Werten von 0,083 (bC bei AG) bis 1,0 (bC bei GG) eine signifikant häufigere Vererbung der Fas-Polymorphismen. Auch die Betrachtung der kombinierten Haplotypen erbrachte keine signifikante Abweichung von den erwarteten Werten ($p_{ETDT}=0,3$).

4.1.2) FasL bei Hashimoto Thyreoiditis

Es folgt die Darstellung der Vererbung der Fas-Liganden-Polymorphismen bei Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis. Auch hier soll zuerst die Verteilung der einzelnen Allele untersucht werden, dann erfolgt eine Analyse auf mögliche Kopplung der Allele und anschließend die Untersuchungen der verschiedenen Subgruppen (Vererbung an Geschwister, Patienten, HLA-DQ/-DR-Haplotypen, CTLA4-Genotypen).

D = C-Allel des Promoter-Polymorphismus = 114 bp
 d = T-Allel des Promoter-Polymorphismus = 98 und 16 bp
 E = C-Allel des EBP-Polymorphismus = 189 und 23 bp
 e = T-Allel des EBP-Polymorphismus = 212 bp
 F = A-Allel des Intron2-Polymorphismus = 230 bp
 f = G-Allel des Intron2-Polymorphismus = 180 und 50 bp
 T = transmittiert
 NT = nicht transmittiert
 ETDT = Extended Transmission Disequilibrium Test

4.1.2.a) Allelverteilung und Kopplungsanalyse (FasL bei Hashimoto Thyreoiditis)

	Ha Index	%	Ha M	%	Ha V	%	HaEltern	%	HaGesamt	%
D	81	60,4	82	55,8	85	59,0	167	57,4	248	58,4
d	53	39,6	65	44,2	59	41,0	124	42,6	177	41,6
Summe	134	100	147	100	144	100	291	100	425	100
E	76	54,3	73	51,4	83	57,2	156	54,4	232	54,3
e	64	45,7	69	48,6	62	42,8	131	45,6	195	45,7
Summe	140	100	142	100	145	100	287	100	427	100
F	96	78,7	93	78,2	98	78,4	191	78,3	287	78,4
f	26	21,3	26	21,8	27	21,6	53	21,7	79	21,6
Summe	122	100	119	100	125	100	244	100	366	100

Die Einzel-Häufigkeit der Polymorphismen ist zwischen Kindern und Eltern prozentual etwa gleich verteilt. Es besteht jedoch eine erhöhte Prävalenz der C- bzw. A-Allele ($p < 0,05$), im Falle des Intron-Polymorphismus ist diese Verteilung hochsignifikant ($p < 0,001$).

	Ha Index	%	Ha M	%	Ha V	%	HaEltern	%	HaGesamt	%
DF	77	14,3	76	13,4	82	13,7	158	13,6	235	13,8
Df	20	3,7	18	3,2	22	3,7	40	3,4	60	3,5
dF	50	9,3	60	10,6	57	9,5	117	10,0	167	9,8
df	23	4,3	24	4,2	26	4,3	50	4,3	73	4,3
DE	70	13,0	68	12,0	79	13,2	147	12,6	217	12,7
De	46	8,6	52	9,2	49	8,2	101	8,7	147	8,6
dE	35	6,5	42	7,4	46	7,7	88	7,5	123	7,2
de	49	9,1	60	10,6	52	8,7	112	9,6	161	9,4
FE	71	13,2	68	12,0	80	13,4	148	12,7	219	12,9
Fe	58	10,8	62	10,9	59	9,9	121	10,4	179	10,5
fE	14	2,6	14	2,5	21	3,5	35	3,0	49	2,9
fe	25	4,6	24	4,2	25	4,2	49	4,2	74	4,3
Summe	538	100	568	100	598	100	1166	100	1704	100

Die jeweils häufigsten Allele (DF, DE, FE, Fe) wurden grau hinterlegt und stellen kumulativ etwa die Hälfte aller Haplotypen (49,9%). Alle weiteren Allele treten mit Häufigkeiten zwischen 3 und 10% auf. Dunkel markiert ist darüber hinaus der fE-Haplotyp im väterlichen Kollektiv, da er von mehr als 20% vom Mittelwert der Gesamtgruppe abweicht.

Zur Kopplungs-Analyse der FasL-Polymorphismen wurde folgendes Linkage Disequilibrium berechnet:

Linkage Disequilibrium (D ± Standardabweichung) $D_{DF} = 0,0688821 \pm 0,0160134$

Linkage Disequilibrium (D ± Standardabweichung) $D_{DE} = 0,1701987 \pm 0,0201736$

Linkage Disequilibrium (D ± Standardabweichung) $D_{FE} = 0,072044 \pm 0,0156964$

Damit besteht zwischen den kombinierten Haplotypen DE ein signifikantes Linkage Disequilibrium, während bei der Auswertung der Haplotypen DF und FE ein zusätzlicher Informationsgewinn möglich ist.

4.1.2.b) Vererbung an Patienten (FasL bei Hashimoto Thyreoiditis)

	T	NT	χ^2	p	ETDT
DFE	22	29	0,961	0,327	7df p: 0,208
DFe	6	9	0,600	0,439	
DfE	2	0	2,000	0,157	
Dfe	1	4	1,800	0,180	
dFE	9	2	4,455	0,035	
dFe	19	17	0,111	0,739	
dfE	0	0	0,000	1,000	
dfe	13	11	0,167	0,683	
DE	23	29	0,692	0,405	3df χ^2 : 3,730 p: 0,292
De	8	13	1,190	0,275	
dE	9	3	3,000	0,083	
de	27	22	0,510	0,475	
DF	29	29	0,000	1,000	3df χ^2 : 0,146 p: 0,986
Df	3	4	0,143	0,705	
dF	24	23	0,021	0,884	
df	13	13	0,000	1,000	
EF	31	31	0,000	1,000	3df χ^2 : 2,773 p: 0,428
Ef	2	0	2,000	0,157	
eF	23	25	0,083	0,773	
ef	15	15	0,000	1,000	
D	45	32	2,195	0,138	
d	32	45	2,195	0,138	
E	33	33	0,000	1,000	
e	33	33	0,000	1,000	
F	20	18	0,105	0,746	
f	18	20	0,105	0,746	

Für die meisten der untersuchten FasL-Haplotypen konnte bei der Betrachtung der Indexpatienten mit Hashimoto Thyreoiditis kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht festgestellt werden. Lediglich bei der Analyse des kombinierten Haplotypen dFE (9 von 11mal vererbt [p=0,035]) ergab sich eine statistische Signifikanz zu Gunsten einer häufigeren Vererbung an die Indexpatienten. Für den kombinierten Haplotypen dE zeigte sich eine Tendenz zu einer häufigeren Vererbung, ebenfalls an die Indexpatienten (9 von 12mal vererbt [p=0,083]).

Die isolierte Betrachtung der einzelnen Polymorphismen ergab keine signifikante Abweichung von den erwarteten Werten: Promoter-Polymorphismus Dd (p=0,138), EBP-Polymorphismus Ee (p=1,0) und Intron2-Polymorphismus Ff (p=0,746).

Auch in der Analyse der kombinierten Haplotypen und der TRANSMIT-Analyse ergab sich kein statistische Signifikanz (p_{ETDT}=0,208, p_{TRAM}=0,65).

4.1.2.c) Vererbung an Geschwister (FasL bei Hashimoto Thyreoiditis)

Da nicht alle Geschwister auf den EBP-Polymorphismus untersucht wurden, erfolgt hier lediglich die Darstellung der Polymorphismen des Promoters und des Introns02.

	T	NT	χ^2	p	ETDT
DF	27	20	1,043	0,307	3df χ^2 : 4,893 p: 0,180
Df	2	0	2,000	0,157	
dF	17	21	0,421	0,516	
df	5	10	1,667	0,197	
D	20	34	3,630	0,057	
d	34	20	3,630	0,057	
F	7	11	0,889	0,346	
f	11	7	0,889	0,346	

In der Betrachtung der gesunden Geschwister konnte bei keinem der untersuchten FasL-Haplotypen ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht festgestellt werden: DF 27 von 47mal vererbt ($p=0,307$), Df 2 von 2mal vererbt ($p=0,157$), dF 17 von 38mal vererbt ($p=0,516$) und df 5 von 15mal vererbt ($p=0,197$). Auch die isolierte Betrachtung der einzelnen Polymorphismen ergab keine signifikante Abweichung von den erwarteten Werten: Promoter-Polymorphismus D/d ($p=0,057$) und Intron2-Polymorphismus F/f ($p=0,346$).

Die Analyse der kombinierten Haplotypen ergab ebenfalls keine statistische Signifikanz ($p_{ETDT}=0,18$).

Sowohl die Einzelauswertung der Vererbung beider Polymorphismen als auch die Auswertung der Haplotypen ergab kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht bei Patienten oder Geschwisterkindern. Lediglich für den Promoter-Polymorphismus ergab sich eine tendentiell häufigere Vererbung des d-Allels an gesunde Geschwister von Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis (34 von 54mal vererbt [$p=0,057$]).

4.1.2.d) HLA-DQA 0501 positiv (FasL bei Hashimoto Thyreoiditis)

Für die Subgruppenanalyse nach HLA-Haplotypen standen 93 Datensätze von Patienten mit HT zur Verfügung. Da für verschiedene Genloci unterschiedlich starke Einflüsse auf das Erkrankungsrisiko nachgewiesen werden konnten, wäre der Einfluß anderer genetischer Faktoren in den Gruppen mit dem jeweils niedrigsten HLA-vermittelten Risiko am stärksten nachweisbar. Zur Relevanz der einzelnen HLA- und CTLA4- Hapotypen siehe 1.5.3).

	T	NT	χ^2	p	ETDT
DFE	17	22	0,641	0,423	7df p: 0,315
DFe	2	0	2,000	0,157	
DfE	3	6	1,000	0,317	
Dfe	1	4	1,800	0,180	
dFE	6	2	2,000	0,157	
dFe	0	0	0,000	1,000	
dfE	13	12	0,040	0,841	
dfe	12	8	0,800	0,371	
DE	18	22	0,400	0,527	
De	6	10	1,000	0,317	
dE	6	4	0,400	0,527	
de	21	15	1,000	0,317	
DF	24	32	1,143	0,285	3df χ^2 : 1,405 p: 0,704
Df	3	4	0,143	0,705	
dF	27	20	1,043	0,307	
df	12	10	0,182	0,670	
EF	23	26	0,184	0,668	3df χ^2 : 2,911 p: 0,406
Ef	2	0	2,000	0,157	
eF	17	18	0,029	0,866	
ef	14	12	0,154	0,695	
D	37	24	2,770	0,096	
d	24	37	2,770	0,096	
E	28	25	0,170	0,680	
e	25	28	0,170	0,680	
F	18	15	0,273	0,602	
f	15	18	0,273	0,602	

Unter den HLA-DQ0501 positiven HT-Patienten konnte kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht festgestellt werden: D 37 von 61mal vererbt (p=0,096), E 28 von 53mal vererbt (p=0,68) und F 18 von 33mal vererbt (p=0,602). Auch die Betrachtung der kombinierten Haplotypen ergab keine signifikante Abweichung von den erwarteten Werten (p-Werte von 0,157 bis 0,866).

Ebenso ergab sich in der Analyse der kombinierten Haplotypen keine statistische Signifikanz ($p_{ETDT}=0,315$).

4.1.2.e) HLA-DR3 positiv (FasL bei Hashimoto Thyreoiditis)

	T	NT	χ^2	p	ETDT
DFE	11	16	0,926	0,336	7df p: 0,069
DFe	2	0	2,000	0,157	
DfE	2	5	1,286	0,257	
Dfe	0	2	2,000	0,157	
dFE	5	0	5,000	0,025	
dFe	0	0	0,000	1,000	
dfE	7	10	0,529	0,467	
dfe	12	6	2,000	0,157	
DE	12	15	0,333	0,564	3df χ^2 : 7,276 p: 0,064
De	2	7	2,778	0,096	
dE	5	0	5,000	0,025	
de	14	11	0,360	0,549	
DF	14	20	1,059	0,303	3df χ^2 : 1,563 p: 0,668
Df	2	2	0,000	1,000	
dF	14	13	0,037	0,847	
df	12	7	1,316	0,251	
EF	17	16	0,030	0,862	3df χ^2 : 4,784 p: 0,188
Ef	2	0	2,000	0,157	
eF	8	15	2,130	0,144	
ef	12	8	0,800	0,371	
D	26	16	2,381	0,123	
d	16	26	2,381	0,123	
E	18	19	0,027	0,869	
e	19	18	0,027	0,869	
F	15	10	1,000	0,317	
f	10	15	1,000	0,317	

In der Subgruppenanalyse nach HLA-DR3-Haplotypen konnte für die meisten der untersuchten FasL-Haplotypen kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht festgestellt werden. Lediglich bei der Analyse der kombinierten Haplotypen dE und dFE (5 von 5mal vererbt [p=0,025]) ergab sich eine statistische Signifikanz zu Gunsten einer häufigeren Vererbung an die HLA-DR3-positive Indexpatienten.

Die isolierte Betrachtung der einzelnen Polymorphismen ergab keine signifikante Abweichung von den erwarteten Werten: Promoter-Polymorphismus Dd (p=0,123), EBP-Polymorphismus E/e (p=0,869) und Intron2-Polymorphismus F/f (p=0,317).

Auch in der Analyse der kombinierten Haplotypen ergab sich kein statistische Signifikanz ($p_{ETDT}=0,069$).

4.1.2.f) CTLA4-Subgruppen (FasL bei Hashimoto Thyreoiditis)

Auch durch die Polymorphismen der CTLA4-Haplotypen ist die Vermittlung eines Risikos zur Entwicklung einer Hashimoto Thyreoiditis gezeigt worden (s. 1.5.3). Der CTLA-Genotyp war bei 84 Patienten der untersuchten Population bekannt und konnten zur Subgruppenanalyse herangezogen werden.

AA	T	NT	χ^2	p	ETDT
DFE	9	9	0,000	1,000	---
DFe	1	0	1,000	0,317	
DfE	3	0	3,000	0,083	
Dfe	0	2	2,000	0,157	
dFE	2	0	2,000	0,157	
dFe	0	1	1,000	0,317	
dfE	6	9	0,600	0,439	
dfe	4	4	0,000	1,000	
DE	10	10	0,000	1,000	3df χ^2 :5,728 p: 0,126
De	3	5	0,500	0,480	
dE	5	1	2,667	0,102	
de	9	11	0,200	0,655	
DF	12	17	0,862	0,353	3df χ^2 : 2,706 p: 0,439
Df	1	2	0,333	0,564	
dF	17	9	2,462	0,117	
df	4	6	0,400	0,527	
EF	14	9	1,087	0,297	3df χ^2 : 2,501 p: 0,475
Ef	1	0	1,000	0,317	
eF	8	12	0,800	0,371	
ef	4	6	0,400	0,527	
D	21	15	1,000	0,317	
d	15	21	1,000	0,317	
E	12	15	0,333	0,564	
e	15	12	0,333	0,564	
F	7	9	0,250	0,617	
f	9	7	0,250	0,617	

AG	T	NT	χ^2	p	ETDT
DFE	6	12	2,000	0,157	---
DFe	0	0	0,000	1,000	
DfE	4	6	0,400	0,527	
Dfe	0	0	0,000	1,000	
dFE	4	0	4,000	0,046	
dFe	0	0	0,000	1,000	
dfE	8	8	0,000	1,000	
dfe	10	6	1,000	0,317	
DE	3	6	1,000	0,317	
De	2	2	0,000	1,000	
dE	1	0	1,000	0,317	
de	7	5	0,333	0,564	
DF	10	20	3,333	0,068	3df χ^2 : 5,611 p: 0,132
Df	2	0	2,000	0,157	
dF	13	8	1,190	0,275	
df	8	5	0,692	0,405	
EF	9	19	3,571	0,059	3df χ^2 : 4,546 p: 0,208
Ef	1	0	1,000	0,317	
eF	11	7	0,889	0,346	
ef	10	5	1,667	0,197	
D	19	11	2,133	0,144	
d	11	19	2,133	0,144	
E	18	10	2,286	0,131	
e	10	18	2,286	0,131	
F	11	5	2,250	0,134	
f	5	11	2,250	0,134	

GG	T	NT	χ^2	p	ETDT
DFE	1	0	1,000	0,317	
DFe	0	0	0,000	1,000	
DfE	0	0	0,000	1,000	
Dfe	0	1	1,000	0,317	
dFE	1	0	1,000	0,317	
dFe	0	0	0,000	1,000	
dfE	1	1	0,000	1,000	
dfe	0	1	1,000	0,317	---
DE	1	0	1,000	0,317	
De	0	1	1,000	0,317	
dE	1	0	1,000	0,317	
de	0	1	1,000	0,317	---
DF	1	0	1,000	0,317	
Df	0	1	1,000	0,317	
dF	2	1	0,333	0,564	
df	0	1	1,000	0,317	---
EF	2	0	2,000	0,157	
Ef	0	0	0,000	1,000	
eF	1	1	0,000	1,000	
ef	0	2	2,000	0,157	---
D	1	1	0,000	1,000	
d	1	1	0,000	1,000	
E	0	2	2,000	0,157	
e	2	0	2,000	0,157	
F	0	2	2,000	0,157	

In den CTLA-4-Subgruppen wurde für die meisten der untersuchten FasL-Haplotypen kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht erreicht. In der Gruppe des CTLA4-Genotypen AG zeigte sich jedoch ein signifikant häufigere Vererbung des dFE-Haplotypen an Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis (4 von 4mal vererbt [p=0,046]). Für die kombinierten Haplotypen DfE in der Gruppe des AA-Genotyps und DF sowie EF in der Gruppe des AG-Genotyps zeigte sich eine tendentiell häufigere Vererbung (p-Werte von 0,059 bis 0,083).

Die isolierte Betrachtung der einzelnen Polymorphismen ergab keine signifikante Abweichung von den erwarteten Werten: Promoter-Polymorphismus D/d (p=1,0), EBP-Polymorphismus E/e (p=0,157) und Intron2-Polymorphismus F/f (p=0,157).

Auch in der der Analyse der kombinierten Haplotypen ergab sich keine statistische Signifikanz.

4.1.3) Bcl-2 bei Hashimoto Thyreoiditis

4.1.3.a) Allelverteilung und Genotypenhäufigkeit (Bcl-2 bei Hashimoto Thyreoiditis)

	Ha Index	%	Ha M	%	Ha V	%	HaEltern	%	HaGesamt	%
A	95	59,7	80	59,3	93	66,0	173	62,7	268	61,6
a	64	40,3	55	40,7	48	34,0	103	37,3	167	38,4
Summe	159	100	135	100	141	100	276	100	435	100

Die Verteilung der Allele A und a ist unter Kindern und Eltern ähnlich gewichtet, das Allel A kommt zu etwas weniger als zwei Drittel (61,6%) vor.

	Ha Index	%	Ha M	%	Ha V	%	HaEltern	%	HaGesamt	%
AA	39	38,2	46	46,0	51	52,0	97	49,0	136	45,3
Aa	56	54,9	32	32,0	39	39,8	71	35,9	127	42,3
aa	7	6,9	22	22,0	8	8,2	30	15,2	37	12,3
Summe	102	100	100	100	98	100	198	100	300	100

Der Genotyp aa ist signifikant seltener in der untersuchten Population anzutreffen (12,3%) als AA und Aa, die gemeinsam etwa 93% der vorliegenden Genotypen ausmachen.

4.1.3.b) Vererbung an Patienten (Bcl-2 bei Hashimoto Thyreoiditis)

	T	NT	χ^2	p
A	31	47	3,282	0,070
a	47	31	3,282	0,070

Bei der Untersuchung der Indexpatienten mit Hashimoto Thyreoiditis konnte kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht für den Bcl2-Polymorphismus festgestellt werden. Es zeigte sich eine Tendenz zur bevorzugten Vererbung des a-Allels an Patienten (47 von 78mal vererbt (p=0,07)).

4.1.3.c) Vererbung an Geschwister (Bcl-2 bei Hashimoto Thyreoiditis)

	T	NT	χ^2	p
A	18	18	0,000	1,000
a	18	18	0,000	1,000

Es ergab sich kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht der Bcl-2-Polymorphismen bei Geschwisterkindern von Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis (18 von 36mal vererbt [p=1,0]).

4.1.3.d) HLA-DQA 0501 positiv (Bcl-2 bei Hashimoto Thyreoiditis)

Für die Subgruppenanalyse nach HLA-Haplotypen standen 98 Patienten-Datensätze zur Verfügung.

	T	NT	χ^2	p
A	21	37	4,414	0,036
a	37	21	4,414	0,036

Unter den HLA-DQ0501 positiven HT-Patienten zeigte sich ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht mit einer signifikant häufigeren Transmission des a-Allels (37 von 58mal vererbt, $p=0,036$).

4.1.3.e) HLA-DR3 positiv (Bcl-2 bei Hashimoto Thyreoiditis)

	T	NT	χ^2	p
A	11	27	6,737	0,009
a	27	11	6,737	0,009

In der Gruppe der HLA-DR3-positiven Patienten wurde eine deutliche Signifikanz für eine bevorzugte Transmission des a-Allels an Indexpatienten erreicht (27 von 38mal vererbt, $p=0,009$).

4.1.3.f) CTLA4-Subgruppen (Bcl-2 bei Hashimoto Thyreoiditis)

Der CTLA-Genotyp war bei 34 Patienten der untersuchten Population bekannt und konnte zur Subgruppenanalyse herangezogen werden.

CTLA4		T	NT	χ^2	p
AA	A	10	22	4,500	0,034
	a	22	10	4,500	0,034
AG	A	13	21	1,882	0,170
	a	21	13	1,882	0,170
GG	A	2	0	2,000	0,157
	a	0	2	2,000	0,157

In der Subgruppenanalyse nach CTLA4-Genotypen konnte eine signifikant häufigere Transmission des a-Allels in der Subgruppe des AA-Genotypen gezeigt werden (22 von 32mal vererbt, $p=0,034$).

4.2) Morbus Basedow

4.2.1) Fas bei Morbus Basedow

Analog zu der Darstellung bei Hashimoto Thyreoiditis soll nun die Vererbung der Fas-Rezeptor-Polymorphismen bei Patienten mit Morbus Basedow folgen. Ebenfalls wird zunächst die Verteilung der einzelnen Allele untersucht, dann erfolgt eine Analyse auf mögliche Kopplung der Allele und anschließend die Analyse eines potentiellen Vererbungsungleichgewichtes bei Patienten, Geschwistern und den verschiedenen Subgruppen (HLA-DQ/-DR-Haplotypen, CTLA4-Genotypen).

B = A-Allel des Promoter-Polymorphismus = 210 und 264 bp

b = G-Allel des Promoter-Polymorphismus = 210, 184 und 80 bp

C = C-Allel des Exon7-Polymorphismus = 178 bp

c = T-Allel des Exon7-Polymorphismus = 128 und 50 bp

T = transmittiert

NT = nicht transmittiert

ETDT = Extended Transmission Disequilibrium Test

4.2.1.a) Allelverteilung und Kopplungsanalyse (Fas bei Morbus Basedow)

	Ba Index	%	BaM	%	BaV	%	BaEltern	%	BaGesamt	%
B	86	58,9	90	63,4	75	55,6	165	59,6	251	59,3
b	60	41,1	52	36,6	60	44,4	112	40,4	172	40,7
Summe	146	100	142	100	135	100	277	100	423	100
C	94	67,1	91	65,9	92	66,2	183	66,1	277	66,4
c	46	32,9	47	34,1	47	33,8	94	33,9	140	33,6
Summe	140	100	138	100	139	100	277	100	417	100

Die Einzel-Häufigkeit der Polymorphismen ist zwischen Kindern und Eltern erneut prozentual etwa gleich verteilt. Es besteht ebenfalls wieder eine erhöhte Prävalenz der C- bzw. A-Allele ($p < 0,05$).

	Ba Index	%	Ba M	%	Ba V	%	BaEltern	%	BaGesamt	%
BC	81	39,9	79	40,1	68	36,8	147	38,5	228	39,0
Bc	31	15,3	38	19,3	28	15,1	66	17,3	97	16,6
bC	53	26,1	41	20,8	52	28,1	93	24,3	146	25,0
bc	38	18,7	39	19,8	37	20,0	76	19,9	114	19,5
Summe	203	100	197	100	185	100	382	100	585	100

Sowohl bei Index-Patienten als auch bei Eltern stellt BC mit knapp 40% aller Haplotypen das häufigste Allel.

Zur Untersuchung einer möglichen Kopplung der Polymorphismen des Fas-Rezeptors wurde das Linkage Disequilibrium berechnet. In diesem Fall weicht es um etwa 6 Standardabweichungen von 0 ab ($D_{BC} = 0,10906 \pm 0,0174$) und ist damit als signifikant zu bezeichnen.

4.2.1.b) Vererbung an Patienten (Fas bei Morbus Basedow)

	T	NT	χ^2	p	ETDT
BC	25	27	0,077	0,782	3df χ^2 : 2,848 p: 0,416
Bc	16	8	2,667	0,102	
bC	17	18	0,029	0,866	
bc	22	27	0,510	0,475	
B	28	32	0,267	0,606	
b	32	28	0,267	0,606	
C	34	30	0,250	0,617	
c	30	34	0,250	0,617	

Für keinen der untersuchten Fas-Haplotypen konnte bei der Betrachtung der Indexpatienten mit Morbus Basedow ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht festgestellt werden: BC 25 von 52mal vererbt ($p=0,782$), Bc 16 von 24mal vererbt ($p=0,102$), bC 17 von 35mal vererbt ($p=0,866$) und bc 22 von 49mal vererbt ($p=0,475$). Auch die isolierte Betrachtung der einzelnen Polymorphismen ergab keine signifikante Abweichung von den erwarteten Werten: Promoter-Polymorphismus B/b ($p=0,606$) und Exon7-Polymorphismus C/c ($p=0,617$). Auch in der Analyse der kombinierten Haplotypen ergab sich keine statistische Signifikanz ($p_{ETDT}=0,416$).

4.2.1.c) Vererbung an Geschwister (Fas bei Morbus Basedow)

	T	NT	χ^2	p	ETDT
BC	10	6	1,000	0,317	3df χ^2 : 1,503 p: 0,682
Bc	2	4	0,667	0,414	
bC	8	8	0,000	1,000	
bc	9	11	0,200	0,655	
B	13	12	0,040	0,841	
b	12	13	0,040	0,841	
C	10	13	0,391	0,532	
c	13	10	0,391	0,532	

Für keinen der untersuchten Fas-Haplotypen konnte bei der Betrachtung der gesunden Geschwister ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht festgestellt werden: BC 10 von 16mal vererbt ($p=0,317$), Bc 2 von 6mal vererbt ($p=0,414$), bC 8 von 16mal vererbt ($p=1,0$) und bc 9 von 20mal vererbt ($p=0,655$). Auch die isolierte Betrachtung der einzelnen Polymorphismen ergab keine signifikante Abweichung von den erwarteten Werten: Promoter-Polymorphismus B/b ($p=0,841$) und Exon7-Polymorphismus C/c ($p=0,532$). Auch in der Analyse der kombinierten Haplotypen ergab sich keine statistische Signifikanz ($p_{ETDT}=0,682$).

Sowohl die Einzelauswertung der Vererbung beider Polymorphismen als auch die Auswertung der Haplotypen ergab somit kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht bei Patienten oder Geschwisterkindern in Familien mit Morbus Basedow.

4.2.1.d) HLA-DQA 0501 positiv (Fas bei Morbus Basedow)

Eine Subgruppenanalyse auf HLA-Haplotypen konnte bei 96 Patienten der untersuchten Population durchgeführt werden, bei denen die HLA-Haplotypen verfügbar waren. Zur Relevanz der einzelnen HLA- und CTLA4- Haplotypen siehe 1.5.3).

	T	NT	χ^2	p	ETDT
BC	23	22	0,022	0,881	3df χ^2 : 5,342 p: 0,149
Bc	15	6	3,857	0,050	
bC	19	20	0,026	0,873	
bc	14	23	2,189	0,139	
B	21	28	1,000	0,317	
b	28	21	1,000	0,317	
C	21	24	0,200	0,655	
c	24	21	0,200	0,655	

Unter den HLA-DQ0501 positiven Patienten mit Morbus Basedow konnte kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht festgestellt werden: B 21 von 49mal vererbt ($p=0,317$), C 21 von 45mal vererbt ($p=0,655$). Die Betrachtung der kombinierten Haplotypen ergab eine signifikante Abweichung von der erwarteten Verteilung zu Gunsten einer überproportional häufigen Transmission des Bc-Haplotypen ($p=0,05$). Für die restlichen Haplotypen ergab sich mit p-Werten von 0,139 bis 0,881 keine statistische Signifikanz.

Daraus resultierte auch im Erweiterten TDT keine statistisch signifikante Abweichung von der erwarteten Vererbunshäufigkeit ($p_{ETDT}=0,149$).

4.2.1.e) HLA-DR3 positiv (Fas bei Morbus Basedow)

	T	NT	χ^2	p	ETDT
BC	12	16	0,571	0,450	3df χ^2 : 4,354 p: 0,226
Bc	8	5	0,692	0,405	
bC	15	8	2,130	0,144	
bc	7	13	1,800	0,180	
B	12	14	0,154	0,695	
b	14	12	0,154	0,695	
C	11	14	0,360	0,549	
c	14	11	0,360	0,549	

Unter den HLA-DR3 positiven GD-Patienten konnte kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht festgestellt werden: BC 12 von 28mal vererbt ($p=0,45$), Bc 8 von 13mal vererbt ($p=0,405$), bC 15 von 23mal vererbt ($p=0,144$) und bc 7 von 20mal vererbt ($p=0,18$). Auch die isolierte Betrachtung der einzelnen Polymorphismen ergab keine signifikante Abweichung von den erwarteten Werten: Promoter-Polymorphismus B/b ($p=0,695$) und Exon7-Polymorphismus C/c ($p=0,549$).

Auch in der Analyse der kombinierten Haplotypen ergab sich keine statistische Signifikanz ($p_{ETDT}=0,226$).

4.2.1.f) CTLA4-Subgruppen (Fas bei Morbus Basedow)

Der CTLA-Genotyp war bei 95 Patienten mit Morbus Basedow bekannt und stand zur Subgruppenanalyse zur Verfügung.

AA	T	NT	χ^2	p	ETDT
BC	7	7	0,000	1,000	3df χ^2 : 1,335 p: 0,721
Bc	4	3	0,143	0,705	
bC	8	5	0,692	0,405	
bc	6	10	1,000	0,317	
B	8	8	0,000	1,000	
b	8	8	0,000	1,000	
C	8	10	0,222	0,637	
c	10	8	0,222	0,637	

AG	T	NT	χ^2	p	ETDT
BC	13	14	0,037	0,847	3df χ^2 : 0,556 p: 0,906
Bc	12	11	0,043	0,835	
bC	13	16	0,310	0,577	
bc	13	10	0,391	0,532	
B	13	14	0,037	0,847	
b	14	13	0,037	0,847	
C	15	13	0,143	0,705	
c	13	15	0,143	0,705	

GG	T	NT	χ^2	p	ETDT
BC	6	9	0,600	0,439	3df χ^2 : 4,348 p: 0,226
Bc	6	1	3,571	0,059	
bC	4	4	0,000	1,000	
bc	4	6	0,400	0,527	
B	6	10	1,000	0,317	
b	10	6	1,000	0,317	
C	9	6	0,600	0,439	
c	6	9	0,600	0,439	

In keiner der untersuchten CTLA4-Subgruppen (AA, AG, GG) ergab sich mit p-Werten von 0,059 (Bc bei GG) bis 1,0 (BC bei AA und bc bei GG) eine signifikant häufigere Vererbung der Fas-Polymorphismen. Auch die Betrachtung der kombinierten Haplotypen erbrachte keine signifikante Abweichung von den erwarteten Werten ($p_{ETDT}=0,721$, $0,906$ bzw. $=0,226$).

4.2.2) FasL bei Morbus Basedow

Die Vererbung der Fas-Liganden-Polymorphismen bei Patienten mit Morbus Basedow. Erneut wird zunächst die Verteilung der einzelnen Allele untersucht werden, dann erfolgt eine Analyse auf mögliche Kopplung der Allele und anschließend die Untersuchungen der verschiedenen Subgruppen (Vererbung an Geschwister, Patienten, HLA-DQ/-DR-Haplotypen, CTLA4-Genotypen).

D = C-Allel = 114 bp

d = T-Allel = 98 und 16 bp

E = C-Allel = 189 und 23 bp

e = T-Allel = 212 bp

F = A-Allel = 230 bp

f = G-Allel = 180 und 50 bp

T = transmittiert

NT = nicht transmittiert

ETDT = Extended Transmission Disequilibrium Test

4.2.2.a) Allelverteilung und Kopplungsanalyse (FasL bei Morbus Basedow)

	Ba Index	%	Ba M	%	Ba V	%	BaEltern	%	BaGesamt	%
D	74	57,8	77	59,2	76	56,7	153	58,0	227	57,9
d	54	42,2	53	40,8	58	43,3	111	42,0	165	42,1
Summe	128	100	130	100	134	100	264	100	392	100
E	76	53,1	77	53,8	72	51,1	149	52,5	225	52,7
e	67	46,9	66	46,2	69	48,9	135	47,5	202	47,3
Summe	143	100	143	100	141	100	284	100	427	100
F	86	80,4	85	75,2	87	79,8	172	77,5	258	78,4
f	21	19,6	28	24,8	22	20,2	50	22,5	71	21,6
Summe	107	100	113	100	109	100	222	100	329	100

Die Verteilungshäufigkeit der Allele ist im Falle des FasL bei Morbus Basedow außerordentlich homogen. Einzige Ausnahme bildet der Polymorphismus F/f, bei dem das F-Allel signifikant häufiger auftritt.

	Ba Index	%	Ba M	%	Ba V	%	BaEltern	%	BaGesamt	%
DF	68	13,8	71	13,4	69	13,5	140	13,5	208	13,6
Df	11	2,2	18	3,4	14	2,7	32	3,1	43	2,8
dF	48	9,8	49	9,3	52	10,2	101	9,7	149	9,7
df	18	3,7	22	4,2	20	3,9	42	4,0	60	3,9
DE	64	13,0	64	12,1	64	12,5	128	12,3	192	12,5
De	44	9,0	47	8,9	47	9,2	94	9,0	138	9,0
dE	37	7,5	38	7,2	37	7,2	75	7,2	112	7,3
de	49	10,0	49	9,3	52	10,2	101	9,7	150	9,8
FE	66	13,4	68	12,9	64	12,5	132	12,7	198	12,9
Fe	56	11,4	55	10,4	58	11,3	113	10,9	169	11,0
fE	10	2,0	19	3,6	13	2,5	32	3,1	42	2,7
fe	20	4,1	28	5,3	22	4,3	50	4,8	70	4,6
Summe	491	100	528	100	512	100	1040	100	1531	100

Die vier häufigsten Allele (DF, DE, FE und Fe) stellen etwa die Hälfte (49,9%) aller Haplotypen. Alle weiteren Allele treten mit Häufigkeiten zwischen 3 und 10% auf. Dunkel markiert sind darüber hinaus die Haplotypen Df und fE bei Index-Patienten sowie der fE-Haplotyp bei den Vätern, da diese mehr als 20% vom Mittelwert der Gesamtgruppe abweichen.

In der Kopplungs-Analyse der FasL-Polymorphismen wurde folgendes Linkage Disequilibrium berechnet:

Linkage Disequilibrium (D ± Standardabweichung) $D_{DF} = 0,06555 \pm 0,0151358$

Linkage Disequilibrium (D ± Standardabweichung) $D_{DE} = 0,1731012 \pm 0,0206955$

Linkage Disequilibrium (D ± Standardabweichung) $D_{FE} = 0,0729942 \pm 0,0155096$

Damit besteht zwischen den kombinierten Haplotypen DE ein signifikantes Linkage Disequilibrium, während bei der Auswertung der Haplotypen DF und FE ein zusätzlicher Informationsgewinn möglich ist.

4.2.2.b) Vererbung an Patienten (FasL bei Morbus Basedow)

	T	NT	χ^2	p	ETDT
DFE	20	23	0,209	0,647	---
DFe	6	3	1,000	0,317	
DfE	2	0	2,000	0,157	
Dfe	2	1	0,333	0,564	
dFE	3	1	1,000	0,317	
dFe	16	21	0,676	0,411	
dfE	0	0	---	---	
dfe	10	10	0,000	1,000	
DE	22	23	0,022	0,881	3df χ^2 : 4,666 p: 0,198
De	8	4	1,333	0,248	
dE	3	1	1,000	0,317	
de	18	23	0,610	0,435	
DF	26	29	0,164	0,686	3df χ^2 : 2,642 p: 0,450
Df	4	1	1,800	0,180	
dF	26	23	0,184	0,668	
df	10	13	0,391	0,532	
EF	24	28	0,308	0,579	3df χ^2 : 1,498 p: 0,685
Ef	3	1	1,000	0,317	
eF	24	25	0,020	0,886	
ef	15	12	0,333	0,564	
D	29	31	0,067	0,796	
d	31	29	0,067	0,796	
E	33	29	0,258	0,611	
e	29	33	0,258	0,611	
F	23	16	1,256	0,262	
f	16	23	1,256	0,262	

Für keinen der untersuchten FasL-Haplotypen konnte bei der Betrachtung der Indexpatienten mit Morbus Basedow ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht festgestellt werden. Die isolierte Betrachtung der einzelnen Polymorphismen ergab ebenfalls keine signifikante Abweichung von den erwarteten Werten: Promoter-Polymorphismus D/d (p=0,796), EBP-Polymorphismus E/e (p=0,611) und Intron02-Polymorphismus F/f (p=0,262). Auch in der erweiterten ETDT-Testung der kombinierten Haplotypen ergab sich keine statistische Signifikanz (p_{DE}=0,198, p_{DF}=0,45, p_{EF}=0,685).

4.2.2.c) Vererbung an Geschwister (FasL bei Morbus Basedow)

Da nicht alle Geschwister auf den EBP-Polymorphismus untersucht wurden, erfolgt hier lediglich die Darstellung der Polymorphismen des Promoters und des Introns02.

	T	NT	χ^2	p	ETDT
DF	11	8	0,474	0,491	3df χ^2 : 3,313 p: 0,346
Df	0	1	1,000	0,317	
dF	6	10	1,000	0,317	
df	5	3	0,500	0,480	
D	8	12	0,800	0,371	
d	12	8	0,800	0,371	
F	6	5	0,091	0,763	
f	5	6	0,091	0,763	

Bei der Betrachtung der gesunden Geschwister von Patienten mit Morbus Basedow konnte bei keinem der untersuchten FasL-Haplotypen ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht festgestellt werden: DF 11 von 19mal vererbt ($p=0,491$), Df 0 von 1mal vererbt ($p=0,317$), dF 6 von 16mal vererbt ($p=0,317$) und df 5 von 8mal vererbt ($p=0,48$). Auch die isolierte Betrachtung der einzelnen Polymorphismen ergab keine signifikante Abweichung von den erwarteten Werten: Promoter-Polymorphismus D/d ($p=0,371$) und Intron02-Polymorphismus F/f ($p=0,763$).

Auch in der Analyse der kombinierten Haplotypen ergab sich keine statistische Signifikanz ($p_{ETDT}=0,346$).

4.2.2.d) HLA-DQA 0501 positiv (FasL bei Morbus Basedow)

Eine Subgruppenanalyse auf HLA-Haplotypen konnte bei 92 Patienten mit Morbus Basedow durchgeführt werden, bei denen die HLA-Haplotypen verfügbar waren. Da für verschiedene Genloci unterschiedlich starke Einflüsse auf das Erkrankungsrisiko nachgewiesen werden konnten, wäre der Einfluß anderer genetischer Faktoren in den Gruppen mit dem jeweils niedrigsten HLA-vermittelten Risiko am stärksten nachweisbar. Zur Relevanz der einzelnen HLA- und CTLA4- Haplotypen siehe 1.5.3).

	T	NT	χ^2	p	ETDT
DFE	11	20	2,613	0,106	
DFe	2	0	2,000	0,157	
DfE	6	3	1,000	0,317	
Dfe	2	1	0,333	0,564	
dFE	3	1	1,000	0,317	
dFe	0	0	---	---	
dfE	12	15	0,333	0,564	
dfe	9	5	1,143	0,285	---
DE	13	20	1,485	0,223	
De	9	4	1,923	0,166	3df
dE	3	2	0,200	0,655	χ^2 :4,185
de	15	14	0,034	0,853	p: 0,242
DF	15	24	2,077	0,150	
Df	4	1	1,800	0,180	3df
dF	20	15	0,714	0,398	χ^2 : 3,670
df	9	8	0,059	0,808	p: 0,299
EF	16	24	1,600	0,206	
Ef	3	0	3,000	0,083	3df
eF	18	19	0,027	0,869	χ^2 : 6,494
ef	13	7	1,800	0,180	p: 0,090
D	24	20	0,364	0,546	
d	20	24	0,364	0,546	
E	29	19	2,083	0,149	
e	19	29	2,083	0,149	
F	20	12	2,000	0,157	
f	12	20	2,000	0,157	

Bei den HLA-DQ0501 positiven Basedow-Patienten konnte kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht festgestellt werden: D 24 von 44mal vererbt (p=0,364), E 29 von 48mal vererbt (p=0,149) und F 20 von 32mal vererbt (p=0,157). Auch die Analyse der kombinierten Haplotypen ergab keine signifikante Abweichung von den erwarteten Werten (p-Werte von 0,09 bis 0,299).

4.2.2.e) HLA-DR3 positiv (FasL bei Morbus Basedow)

	T	NT	χ^2	p	ETDT
D FE	9	12	0,429	0,513	---
D Fe	1	0	1,000	0,317	
D fE	3	2	0,200	0,655	
D fe	0	1	1,000	0,317	
d FE	1	0	1,000	0,317	
d Fe	0	0	---	---	
d fE	5	10	1,667	0,197	
d fE	7	1	4,500	0,034	
D E	10	12	0,182	0,670	
D e	3	4	0,143	0,705	
d E	2	0	2,000	0,157	
d e	11	10	0,048	0,827	
D F	12	14	0,154	0,695	3df χ^2 : 0,860 p: 0,835
D f	1	1	0,000	1,000	
d F	9	10	0,053	0,819	
d f	7	4	0,818	0,366	
E F	10	14	0,667	0,414	3df χ^2 : 6,381 p: 0,095
E f	1	0	1,000	0,317	
e F	7	11	0,889	0,346	
e f	9	2	4,455	0,035	
D	16	15	0,032	0,857	
d	15	16	0,032	0,857	
E	18	12	1,200	0,273	
e	12	18	1,200	0,273	
F	13	6	2,579	0,108	
f	6	13	2,579	0,108	

In der Subgruppenanalyse nach HLA-DR3-Haplotypen konnte für die meisten der untersuchten FasL-Haplotypen kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht festgestellt werden. Lediglich bei der Analyse des kombinierten Haplotypen dfe (7 von 8mal vererbt [p=0,035]) ergab sich eine statistische Signifikanz zu Gunsten einer häufigeren Vererbung an die HLA-DR3-positiven Indexpatienten. In der isolierten Betrachtung der einzelnen Polymorphismen ergab sich keine statistisch signifikante Abweichung von den erwarteten Werten: Promoter-Polymorphismus D/d (p=0,857), EBP-Polymorphismus E/e (p=0,237) und Intron2-Polymorphismus F/f (p=0,108).

Auch in der Analyse der kombinierten Haplotypen ergab sich keine statistische Signifikanz (p_{ETDT} =0,095 bis 0,835).

4.2.2.f) CTLA4-Subgruppen (FasL bei Morbus Basedow)

Der CTLA-Genotyp war bei 73 Patienten der untersuchten Population bekannt und konnten zur Subgruppenanalyse herangezogen werden.

AA	T	NT	χ^2	p	ETDT
DFE	5	8	0,692	0,405	
DFe	0	0	---	---	
DfE	2	1	0,333	0,564	
Dfe	0	0	---	---	
dFE	0	0	---	---	
dFe	0	0	---	---	
dfE	2	6	2,000	0,157	
dfe	8	2	3,600	0,058	---
DE	5	8	0,692	0,405	
De	2	1	0,333	0,564	
dE	0	0	---	---	
de	8	6	0,286	0,593	---
DF	8	8	0,000	1,000	
Df	0	0	---	---	
dF	2	7	2,778	0,096	
df	8	3	2,273	0,132	---
EF	5	10	1,667	0,197	
Ef	0	0	---	---	
eF	3	6	1,000	0,317	
ef	10	2	5,333	0,021	---
D	8	7	0,067	0,796	
d	7	8	0,067	0,796	
E	10	6	1,000	0,317	
e	6	10	1,000	0,317	
F	12	4	4,000	0,046	
f	4	12	4,000	0,046	

AG	T	NT	χ^2	p	ETDT
DfE	11	8	0,474	0,491	---
DfE	1	0	1,000	0,317	
DfE	3	2	0,200	0,655	
Dfe	1	1	0,000	1,000	
dFE	2	1	0,333	0,564	
dFe	0	0	---	---	
dfE	8	10	0,222	0,637	
dfe	0	4	4,000	0,046	
DE	12	8	0,800	0,371	3df χ^2 : 4,946 p: 0,176
De	4	3	0,143	0,705	
dE	3	1	1,000	0,317	
de	5	12	2,882	0,090	
DF	12	9	0,429	0,513	3df χ^2 : 7,359 p: 0,061
Df	2	1	0,333	0,564	
dF	12	11	0,043	0,835	
df	0	5	5,000	0,025	
EF	13	11	0,167	0,683	3df χ^2 : 4,116 p: 0,249
Ef	2	0	2,000	0,157	
eF	13	14	0,037	0,847	
ef	2	5	1,286	0,257	
D	11	14	0,360	0,549	
d	14	11	0,360	0,549	
E	16	15	0,032	0,857	
e	15	16	0,032	0,857	
F	7	6	0,077	0,782	
f	6	7	0,077	0,782	

GG	T	NT	χ^2	p	ETDT
DfE	5	5	0,000	1,000	
DfE	1	0	1,000	0,317	
DfE	0	0	---	---	
Dfe	0	0	---	---	
dFE	0	0	---	---	
dFe	0	0	---	---	
dfE	6	5	0,091	0,763	
dfe	2	4	0,667	0,414	---
DE	6	5	0,091	0,763	
De	0	0	---	---	
dE	0	0	---	---	
de	5	6	0,091	0,763	---
DF	6	6	0,000	1,000	
Df	1	0	1,000	0,317	3df
dF	7	5	0,333	0,564	χ^2 : 3,025
df	2	5	1,286	0,257	p: 0,388
EF	7	5	0,333	0,564	
Ef	1	0	1,000	0,317	3df
eF	6	6	0,000	1,000	χ^2 : 2,501
ef	2	5	1,286	0,257	p: 0,475
D	9	8	0,059	0,808	
d	8	9	0,059	0,808	
E	5	8	0,692	0,405	
e	8	5	0,692	0,405	
F	3	6	1,000	0,317	
f	6	3	1,000	0,317	

In der Subgruppenanalyse nach CTLA4-Haplotypen konnte für die meisten der untersuchten FasL-Haplotypen kein statistisch signifikantes Vererbungsungleichgewicht festgestellt werden. Bei folgenden Haplotypen wurde ein signifikanter p-Wert errechnet: ef (p=0,021) und F (p=0,046) in der Subgruppe der Patienten mit AA-Genotyp, dfe und df in der Subgruppe mit AG-Genotyp.

Die isolierte Betrachtung der einzelnen Polymorphismen ergab keine signifikante Abweichung von den erwarteten Werten: Promoter-Polymorphismus D/d (p=0,808), EBP-Polymorphismus E/e (p=0,405) und Intron02-Polymorphismus F/f (p=0,317).

Auch in der der Analyse der kombinierten Haplotypen ergab sich keine statistische Signifikanz.

4.2.3) Bcl-2 bei Morbus Basedow

4.2.3.a) Allelverteilung und Kopplungsanalyse (Bcl-2 bei Morbus Basedow)

	Ba Index	%	Ba M	%	Ba V	%	BaEltern	%	BaGesamt	%
A	94	67,1	91	65,9	92	66,2	183	66,1	277	66,4
a	46	32,9	47	34,1	47	33,8	94	33,9	140	33,6
Summe	140	100	138	100	139	100	277	100	417	100

Die Verteilung der Polymorphismen A und a ist unter Kindern und Eltern ähnlich gewichtet, das Allel A kommt zu etwa zwei Drittel (66,4%) vor.

	Ba Index	%	Ba M	%	Ba V	%	BaEltern	%	BaGesamt	%
AA	54	54,0	47	50,0	46	50,5	93	50,3	147	51,6
Aa	39	39,0	38	40,4	38	41,8	76	41,1	115	40,4
aa	7	7,0	9	9,6	7	7,7	16	8,6	23	8,1
Summe	100	100	94	100	91	100	185	100	285	100

Der Genotyp aa ist signifikant seltener in der untersuchten Population anzutreffen (8%) als die Allele AA und Aa, die gemeinsam 93% der vorliegenden Genotypen ausmachen.

4.2.3.b) Vererbung an Patienten (Bcl-2 bei Morbus Basedow)

	T	NT	χ^2	p
A	31	23	1,185	0,276
a	23	31	1,185	0,276

Bei der Untersuchung der Indexpatienten mit Hashimoto Thyreoiditis konnte kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht für den Bcl2-Polymorphismus festgestellt werden ($p=0,276$).

4.2.3.c) Vererbung an Geschwister (Bcl-2 bei Morbus Basedow)

	T	NT	χ^2	p
A	11	7	0,889	0,346
a	7	11	0,889	0,346

Bei gesunden Geschwistern von Patienten mit Morbus Basedow zeigte sich kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht für den Bcl2-Polymorphismus ($p=0,346$).

4.2.3.d) HLA-DQA 0501 positiv (Bcl-2 bei Morbus Basedow)

Bei 87 Patienten lagen Daten der HLA-Typisierung vor, und eine Subgruppenanalyse auf HLA-Haplotypen war möglich.

	T	NT	χ^2	p
A	23	17	0,900	0,343
a	17	23	0,900	0,343

Ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht für den Bcl2-Polymorphismus zeigte sich in der Subgruppe der HLA-DQA 0501 positiven Patienten mit Morbus Basedow nicht ($p=0,343$).

4.2.3.e) HLA-DR3 positiv (Bcl-2 bei Morbus Basedow)

	T	NT	χ^2	p
A	12	9	0,429	0,513
a	9	12	0,429	0,513

In der Subgruppenanalyse nach HLA-DR3-Haplotypen konnte für den untersuchten Bcl-2-Polymorphismus kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht festgestellt werden ($p=0,513$).

4.2.3.f) CTLA4-Subgruppen (Bcl-2 bei Morbus Basedow)

Der CTLA-Genotyp war bei 27 Patienten mit Morbus Basedow bekannt.

CTLA4		T	NT	χ^2	p
AA	A	8	9	0,059	0,808
	a	9	8	0,059	0,808
AG	A	20	10	3,333	0,068
	a	10	20	3,333	0,068
GG	A	3	4	0,143	0,705
	a	4	3	0,143	0,705

In keiner der Subgruppen nach CTLA4-Haplotypen konnte für die untersuchten FasL-Haplotypen ein statistisch signifikantes Vererbungsungleichgewicht festgestellt werden.

5) Diskussion

5.1) Fas/FasL- und Bcl2-Polymorphismen bei Hashimoto Thyreoiditis

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten 100 Familien mit mindestens einem an Hashimoto Thyreoiditis erkrankten Kind untersucht werden, in 14 Fällen waren zwei Kinder, in 22 Familien außerdem ein Elternteil betroffen. Das Verhältnis männlicher zu weiblicher Patienten betrug 1:5.

Die DNA aller Familienmitglieder wurde auf sieben verschiedene Polymorphismen gescreent, die Genabschnitte für die pro-apoptotischen Moleküle Fas und FasLigand sowie das anti-apoptotische Molekül Bcl2 kodieren. Im Fas-Gen wurden ein Promoter-Polymorphismus an Position 670 (A-G-Austausch) und ein Polymorphismus in Exon 7 (C-T) untersucht, im FasL-Gen erfolgte die Analyse zweier SNPs in der Promoter-Region (C-T an Position 843 und C-T in der Enhancer Binding Protein-Region (EBP)), außerdem eines Polymorphismus an Position 124 in Intron 2 (IVS2nt-124). Im Bcl-2-Gen wurde ein A-G-Austausch an Position 1955 betrachtet.

Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Polymorphismen keinen wesentlichen Beitrag zur Vermittlung des genetischen Risikos für Hashimoto Thyreoiditis leisten.

Ein statistisch signifikantes Vererbungsungleichgewicht ergab sich lediglich in den Subgruppenanalysen für den Polymorphismus des Bcl2-Gens. Bei HLA-DQ0501 positiven Patienten zeigte sich eine signifikant häufigere Transmission des a-Allels ($p=0,036$), bei HLA-DR3-positiven Patienten wurde eine deutliche Signifikanz für eine bevorzugte Transmission des a-Allels an Indexpatienten erreicht ($p=0,009$) und in der Subgruppe des CTLA4-AA-Genotyps konnte eine signifikant häufigere Transmission des a-Allels in der gezeigt werden ($p=0,034$).

Bei der Untersuchung aller Indexpatienten und Geschwister mit Hashimoto Thyreoiditis konnte kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht für den Bcl2-Polymorphismus festgestellt werden. Eine Tendenz zur bevorzugten Vererbung des a-Allels an Patienten war auszumachen ($p=0,07$).

Bei der Untersuchung der Fas-Polymorphismen wurde kein statistisch signifikantes Vererbungsungleichgewicht beobachtet. Weder in der Betrachtung der Indexpatienten mit Hashimoto Thyreoiditis noch bei gesunden Geschwister wurde eine veränderte Transmission gezeigt. Auch in der Subgruppenanalyse auf HLA-Haplotypen DQA1 0501 oder DR3 (durchgeführt bei 98 Patienten) noch in den untersuchten CTLA4-Subgruppen (Genotyp AA, AG, GG; durchgeführt bei 96 Patienten) konnte kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht festgestellt werden.

In der Analyse der FasL-Polymorphismen konnte für den Promoter-Polymorphismus eine tendentiell häufigere Vererbung des d-Allels an gesunde Geschwister von Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis ($p=0,057$) beobachtet werden.

Außerdem ergab sich für den kombinierten Haplotypen dFE eine statistische Signifikanz zu Gunsten einer häufigeren Vererbung an die Indexpatienten ($p=0,035$), für den kombinierten Haplotypen dE zeigte sich hier eine Tendenz zu einer häufigeren Vererbung ($p=0,083$).

Die Subgruppenanalysen nach HLA-Typen (bekannt bei 93 Patienten) ergab kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht für DQ0501-positive Patienten. In der

Subpopulation der DR3-positiven Indexpatienten ergab sich eine statistische Signifikanz zu Gunsten einer häufigeren Vererbung der kombinierten Haplotypen dE und dFE ($p=0,025$). Der CTLA4-Genotyp stand bei 84 Patienten zur Verfügung. In der Gruppe des AG-Genotyps zeigte sich eine signifikant häufigere Vererbung des dFE-Haplotypen an Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis ($p=0,046$) und eine tendentiell häufigere Vererbung für DF sowie EF; ebenso wie für den kombinierten Haplotypen DfE in der Gruppe des AA-Genotyps (p -Werte von 0,059 bis 0,083). Diese Ergebnisse sind jedoch aufgrund der geringen Größe des Kollektivs und der außerordentlich kleinen Subgruppen nur mit Vorsicht zu bewerten.

5.2) Fas/FasL- und Bcl2-Polymorphismen bei Morbus Basedow

Von den 109 Familien mit an Morbus Basedow erkrankten Kindern war in vier Familien ein weiteres Geschwisterkind ebenfalls erkrankt, in 8 Familien wurde die Erkrankung auch bei einem Elternteil diagnostiziert.

Für die untersuchten Polymorphismen ergab sich kein relevanter Beitrag zur Vermittlung des genetischen Risikos für Morbus Basedow.

Ein grenzwertig statistisch signifikantes Vererbungsungleichgewicht konnte lediglich für den Bc-Haplotypen des Fas-Rezeptor in der Subgruppenanalyse der HLA-DQ0501 positiven Patienten ($p=0,05$) gezeigt werden. Bei der Auswertung der weiteren Fas-Polymorphismen ergab sich eine Tendenz zu einer häufigeren Vererbung des Bc-Haplotypen an Patienten mit GG-Phänotyp des CTLA4-Polymorphismus ($p=0,059$), für alle anderen untersuchten Polymorphismen des Fas-Gens ergab sich weder bei Indexpatienten noch bei gesunden Geschwistern, auch nicht in den untersuchten Subgruppen mit HLA-Haplotypen 0501 bzw. DR3 (bekannt bei 96 Patienten) oder den CTLA4-Genotypen (bekannt bei 95 Patienten) eine statistische Signifikanz.

Die weiteren Auswertungen, bei denen sich ein statistisch signifikantes Vererbungsungleichgewicht ergab, sind aufgrund der geringen Fallzahl nur von eingeschränkter Aussagekraft. Es handelt sich hierbei um vier Polymorphismen des FasL-Gens: F-Allel und ef-Haploytp in der Analyse der AA-Genotypen ($p=0,046$ bzw. 0,021) sowie df- und dfe-Haplotypen in der Gruppe der AG-positiven Indexpatienten ($p=0,025$ bzw. 0,046). Die weiteren Analysen der FasL-Polymorphismen sowohl der Promoter- als auch der Intron-Lokalisation ergaben keine statistische Signifikanz.

Bei der Analyse für den Polymorphismus des Bcl2-Gens konnte bei der Untersuchung aller Indexpatienten und Geschwister mit Morbus Basedow kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht für den untersuchten Polymorphismus festgestellt werden.

Die Subgruppenanalysen nach HLA-Typen (durchgeführt bei 87 Patienten) ergab kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht für DQ0501-positive oder DR3-positive Patienten. Der CTLA-Genotyp stand bei 27 Patienten zur Verfügung und ergab auch hier keine signifikante Abweichung von der erwarteten Vererbung.

5.3) Die Rolle apoptotischer Signaltransduktion in der Pathogenese der Schilddrüsenautoimmunität

Auch wenn der Fas/FasL-Signalweg viele einzigartige Funktionen in der Regulation des Immunsystems und in der Pathogenese der autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen erfüllt, konnte für die untersuchten Polymorphismen in diesem Patientenkollektiv keine genetische Assoziation zu Hashimoto Thyroiditis oder Morbus Basedow belegt werden.

Die vielfältigen Mechanismen, durch die eine deregulierte Apoptose zur Ausbildung einer autoimmunen Endokrinopathie beitragen kann, wurden in Abschnitt 1.4) detailliert besprochen: Die Relevanz sowohl in der Entwicklung generalisierter Autoimmunerkrankungen durch Steuerung von Reifung des Immunsystems und Modulation der spezifischen Immunantwort im adulten Organismus als auch in der Pathogenese organspezifischer Erkrankungen.

Aufgrund mehrerer Beobachtungen spielt insbesondere der Fas/FasL-vermittelte Signaltransduktionsweg eine entscheidende Rolle in der organspezifischen Autoimmunität. So wird die Aktivierung zytotoxischer CD8-T-Zellen und somit die Einleitung der Apoptose ihrer Zielzellen durch Fas vermittelt¹²⁸.

Des Weiteren schützt die Expression von FasL in physiologischem Milieu immunprivilegierte Organe, also Gewebe, die dem Immunsystem nicht oder nur in geringerem Ausmaß zugänglich sind, um ausgedehnte Entzündungsreaktionen und Gewebsdestruktion zu verhindern¹²⁹. Dies gilt zum Beispiel für die Cornea, reproduktive Organe und das Gehirn. Die Definition der immunologisch privilegierten Gewebe wurde bereits 1977 etabliert¹³⁰, am Beispiel der Blut-Hirn-Schranke konnte die funktionelle Relevanz des Fas/FasL-Systems 1999 gezeigt werden¹³¹. Auch im Kontext der Schilddrüsenautoimmunität wurde dieser Mechanismus postuliert und die Schilddrüse als immunprivilegiertes Gewebe bewertet, besonders nachdem experimentell die transgene Expression von FasL auf Thyreozyten die Entstehung einer Autoimmun-Thyreoiditis verhindern konnte¹³².

Allerdings waren die Daten über das schilddrüsenpezifische Expressionsmuster von Fas und FasL zunächst aufgrund methodischer Schwierigkeiten bei der Evaluation Fas-vermittelter Apoptose inkonsistent. So ist die Definition „gesunder Kontrollen“ schwierig bei der Asservation geeigneter Gewebe. Schilddrüsen-Gewebe gesunder Kontrollpersonen ist aus ethischen Gründen nur in Ausnahmefällen zu gewinnen, ex vivo kultivierte Thyreozyten exprimieren spontan vermehrt Fas und sind daher ungeeignet, und die kontralateralen Lappen aus Exstirpationen bei Carcinom- oder Struma-Patienten können aufgrund der möglichen Beteiligung apoptotischer Prozesse an der Carcinomentstehung ebenfalls nur bedingt verwertet werden. Darüber hinaus bestehen auch Defizite bei der Auswahl der FasL-Antikörper, da verschiedene Produkte mit sehr unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität verwendet werden^{133,134}.

Durch zwei Studien konnten die kontroversen Resultate geklärt werden. Hiromatsu et al. untersuchten die Rolle des Fas-Signalwegs bei GD¹³⁵ und Mitiades et al. die Expression von FasL in Schilddrüsen-Carcinomen¹³⁶. Während Hiromatsu et al. mRNA mit Hilfe von Northern blotting oder rtPCR nachwies und die Expressionsmuster mit erhöhter Apoptose-Aktivität korrelierten, verwendeten Mitiades et al. kommerzielle anti-FasL-Antikörper und in situ hybridization.

Beide Studien kamen zu dem Ergebnis, daß bereits auf normalem Schilddrüsengewebe Fas exprimiert wird und stimmen darin mit den meisten publizierten Studien überein.

Somit werden die bisherigen Ergebnisse unterstützt, nach denen Hashimoto Thyreoiditis auf einer gesteigerten Apoptose-Induktion im Rahmen einer erhöhten Expression von pro-apoptotischem Fas und erniedrigter Expression von anti-apoptotischem Bcl-2 in Thyreozyten basiert, während die Ausbildung eines Morbus Basedow durch die Apoptose der infiltrierenden Lymphozyten nach Interaktion mit dem vermehrt exprimierten FasL auf Thyreozyten gekennzeichnet ist.

Darüber hinaus gibt es Hinweise auf die pathophysiologische Relevanz weiterer Apoptose-vermittelnder Rezeptor-Systeme. Eine Möglichkeit besteht in der Induktion von TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*), das sowohl in Lymphozyten von Patienten mit Autoimmunthyreoiditis als auch in Schilddrüsenfollikeln nach Stimulation mit den inflammatorischen Zytokinen TNF- α , IL-1 β und IFN- γ exprimiert wird und den programmierten Zelltod auslösen kann¹³⁷. Entscheidend hierbei ist eine inflammatorische Kostimulation oder eine experimentelle Präinkubation mit Cyclohexamid.

Auch die Vermittlung einer erhöhten Sensibilität gegenüber der Fas-vermittelten Apoptose kann durch die Behandlung mit Zytokinen oder Cyclohexamid beeinflusst werden. Untersuchungen des Fas-Signalwegs ergaben, daß IL-2¹³⁸ oder eine Kombination aus TNF- α , IL-1 β und IFN- γ die Zielzellen für Fas-Apoptose sensibilisiert, übereinstimmend damit konnte eine Resistenz gegenüber dem Fas-Signalweg in Zellkulturen von Patienten mit Autoimmunerkrankungen oft nur bei niedrigen IL-2-Leveln nachgewiesen werden. Die Fas-induzierte Apoptose der Lymphozyten ist also nur zu unterdrücken, wenn es sich um eine schwache Entzündungsreaktion handelt und im Rahmen einer massiven Entzündung durch eine Fas-Sensibilisierung durch hohe IL-2-Leveln abgelöst wird. Auf die mögliche funktionelle, diagnostische und therapeutische Konsequenz dieser Kenntnisse soll im Folgenden eingegangen werden.

5.4) Ausblick

Autoimmune Thyreopathien sind häufige Ursachen einer Schilddrüsendysfunktion, werden jedoch meist erst in einem Stadium diagnostizierbar, in dem die lymphozytäre Infiltration mit entsprechender Destruktion bzw. Hyperplasie der Schilddrüse bereits fortgeschritten ist. Auch eine kausale Therapie, die den Ausbruch der Erkrankung verhindert, konnte bisher nicht etabliert werden, und wäre auch nur dann möglich, wenn eine Prädisposition früh erkannt wird.

Daher ist die Entwicklung früher diagnostischer Methoden, unter anderem auf der Basis einer genetischen Risikostratifizierung, von klinischer Bedeutung.

Bei der Ermittlung des Erkrankungsrisikos für autoimmune Schilddrüsenerkrankungen geht man von einem prozentual hohen Anteil einer genetischen Prädisposition aus (ca. 80% bei Morbus Basedow). Bisher bekannte Risikomarker sind im Bereich der MHC-Region auf Chromosom 6 und in Polymorphismen des CTLA4-Gens lokalisiert worden (siehe 1.5.3), tragen jedoch nur zu einem geringen Prozentsatz zu dem vermuteten genetischen Gesamtrisiko bei (MHC-Polymorphismen vermitteln etwa 10-20%¹¹⁹).

Im Folgenden sollen daher weitere Kandidaten für die Durchführung genetischer Assoziationsstudien diskutiert werden, die sich auf dem Hintergrund pathophysiologischer Überlegungen und funktioneller Differenzen ergeben.

Rolle der Zytokine

Wie bereits in 5.3) erwähnt sind Zytokine in der Pathogenese der organspezifischen Autoimmunendokrinopathien von entscheidender Bedeutung.

Klinische Hinweise darauf ergaben sich aus der Beobachtung, dass das Auftreten von Schilddrüsenantikörpern ohne Anzeichen eines klinischen Korrelats zwar autosomal dominant vererbt zu werden scheint (das Auftreten von Antikörpern ist auch bei etwa 30-50% der direkten Verwandten der Patienten beschrieben¹³⁹), positive Autoantikörper-Titer allerdings nicht mit dem Erkrankungs-Ausbruch gleich zu setzen sind. Die Aktivierung der B-Zell-Immunität durch Varianten in MHC oder Immunglobulinen kann somit nicht allein krankheitsauslösend sein.

Bei Patienten hingegen, die eine immunmodulatorische Therapie mit Zytokinen erhalten, ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Schilddrüsenfunktionsstörung erhöht.

So wird unter Interferon-Therapie beispielsweise im Rahmen einer Multiplen Sklerose in 6,2% der Fälle eine Schilddrüsendysfunktion beobachtet, wobei mit 3,9% eine Hypothyreose häufiger als eine Hyperthyreose auftritt. Die Dysfunktion verläuft überwiegend subklinisch, in nahezu 60% der Fälle kommt es zu einer Spontanremission¹⁴⁰.

Bei Patienten, die im Rahmen einer viralen Hepatitis einer INF- α Therapie unterzogen werden, kann sogar in 15% der Fälle eine Hypothyreose auftreten, bzw. es kommt zur Bildung von Anti-TPO-Antikörpern¹⁴¹, während im Rahmen einer IL-2-Therapie eine Hyperthyreose im Sinne eines Morbus Basedow entstehen kann¹⁴². Ein engmaschiges Monitoring der Schilddrüsenparameter ist bei Patienten mit Interferon-Therapie daher indiziert.

Auch experimentell konnte die Relevanz des spezifischen Zytokin-Milieus bei der Induktion der Schilddrüsendestruktion über apoptotische Signaltransduktion gezeigt werden, als in Schilddrüsen von Mäusen mit ektopter Expression von FasL in Thyreozyten keine auto- oder parakrine Thyreozyten-Destruktion nachgewiesen werden konnte¹³².

Auch als sich im Vergleich der Expressionsmuster der apoptotischen Signalmoleküle Fas und FasL auf Thyreozyten keine Unterschiede zwischen Morbus Basedow und Hashimoto Thyreoiditis ergaben, jedoch Unterschiede in der Regulation der Aktivität von Caspasen und anti-apoptotischem FLIP und Bcl unter Stimulation mit Interferon und Interleukinen auftraten, zeigte sich, dass die Regulation apoptose-induzierender Proteine durch verschiedene Zytokinmilieus kontrolliert werden kann¹⁰⁰.

Überraschenderweise ist durch therapeutische Dosen von INF- γ und β -IFN trotz des Einflusses auf die Aktivierung von TH1-Zellen keine Induktion von Schilddrüsen-autoimmunität oder Schilddrüsendysfunktion berichtet worden.

Ob sich in der Modulation der Zytokin-Milieus künftig mögliche Therapieansätze bieten, ist daher abzuwarten.

Mechanismen der Lymphozyten-Akkumulation

Chemokine stellen eine Untergruppe der Zytokine dar, deren Funktion nicht in der Expansion und Differenzierung von Lymphozyten, sondern in der Regulation deren Migration besteht. Einige dieser Chemokine werden in Thyreozyten von Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen überexprimiert, dazu gehören MIP (*macrophage inflammatory protein*) -1 α und β , IP-10 (γ -IFN-inducible protein) und RANTES. Da infiltrierende T-Zellen vor allem Rezeptoren für die beiden letztgenannten exprimieren, liegt eine mögliche funktionelle Relevanz dieser Chemokine in der Attraktion von Lymphozyten nahe. Auch Chemokine, auf denen die Organisation der Lymphfollikel beruht (CXCL12, 13 und 22), werden in Schilddrüsen von Autoimmunpatienten in einem Ausmaß überexprimiert, das mit dem Serum-Level der Schilddrüsenantikörper korreliert.

Darüber hinaus ist die Expression bestimmter Selektine und Integrine (ICAM-1, VCAM-1, E- und P-Selektine) auf den Endothelzellen der betroffenen Patienten erhöht und kann durch Verlängerung der endothelialen Kontaktzeit in Adhäsion und Transmigration münden. Die Relevanz der Chemokine in der Entstehung der autoimmunen Thyreopathien ist jedoch bisher nur unzureichend verstanden.

Rolle weiterer Apoptose-Induktoren

Neben der in dieser Arbeit untersuchten Induktion von Apoptose durch das Fas/FasL-System spielt in der Entstehung von Schilddrüsenautoimmunerkrankungen der TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*)-vermittelte Signalweg eine entscheidende Rolle. TRAIL-mRNA wird in Schilddrüsen-infiltrierenden Lymphozyten von AITD-Patienten exprimiert und kann nach Stimulation mit den Zytokinen IFN- γ , TNF- α und IL-1 β auch auf Schilddrüsenfollikeln induziert werden. Allerdings wurde durch die reine Expression von TRAIL-Rezeptoren auf Thyreozyten keine Apoptose-Induktion beobachtet. Erst unter definierten externen Einflüssen (z.B. nach Stimulation mit Cyclohexamid) entsteht eine massive Schilddrüsendestruktion, was den Schluß nahe legt, dass auch für die Induktion von Apoptose über den TRAIL-Signalweg das Vorliegen eines spezifischen Milieus notwendig ist¹³⁷.

Es ist daher wenn auch nicht ausgeschlossen, so doch fraglich, ob allein durch Polymorphismen in dieser Signaltransduktionskaskade die Transmission eines relevanten Risikos für die Entstehung von Schilddrüsenautoimmunerkrankungen zu erwarten ist.

Rolle weiterer Apoptose-Inhibitoren

In dieser Arbeit wurde als Inhibitor der FasL-vermittelten Apoptose ein Polymorphismus in der Region des Bcl-2-Gens untersucht. Weitere, wenn auch unspezifische anti-apoptotische Moleküle stellen *Inhibitors of apoptosis proteins* (IAPs) dar. Diese wurden ursprünglich in Baculoviren und Drosophila entdeckt, und deren exogene Expression konnte experimentell induzierte Apoptose inhibieren¹. Als mögliche Mechanismen werden eine direkte Interaktion mit Caspasen sowie die Induktion von „Caspasen-Suizid“ diskutiert. Für einige Krankheitsbilder konnte eine Beteiligung dieser IAPs bereits gezeigt werden, unter anderem für die Onkogenese, auch des Schilddrüsenkarzinoms, spinale Muskelatrophie und den ischämiebedingten neuronalen Zelluntergang. Ihre Rolle in der Schilddrüsenautoimmunität ist bisher jedoch nicht untersucht.

Variationen des Gen-Expressionsmusters

Auch nach der vollständigen Entschlüsselung des menschlichen Genoms bleibt weitgehend unbekannt, welchen Einfluß Variationen in der Expression einzelner Gene auf deren funktionelle Relevanz haben, und in welchem Ausmaß die interindividuellen Unterschiede in den Expressions-Niveaus genetisch determiniert sind. In Untersuchungen an *Drosophila* und Mäusen scheint ein genetischer Einfluß auf Expressionsmuster nahe zu liegen, da geschlechts- und stammes-spezifische Unterschiede in der Expression bestimmter Gene gezeigt werden konnten^{143,144}.

Untersuchungen der Variabilität der Genexpression am Beispiel von humanen Lymphoblasten konnten ebenfalls eine hereditäre Komponente in der Regulation zeigen¹⁴⁵.

Mit Hilfe von cDNA-Microarrays wurden zunächst Gene selektiert, deren Expressions-Profile die größten interindividuellen Unterschiede zeigten. Hierbei handelte es sich vor allem um Gene, die Proteine kodieren, die am Aufbau des Zellskeletts und an Protein-Modifikation und -Transport beteiligt sind. Die geringste Expressions-Variabilität zeigte sich bei Genen für Signaltransduktion und Zelltod bzw. Proliferation. Die Expression der hochvariablen Gene war bei eineiigen Zwillingen am strengsten konserviert, bei Geschwistern zeigte sich eine mittelgradige Variabilität, und am stärksten variierte sie zwischen nicht verwandten Individuen (Variabilität hier 3-11 mal so hoch wie bei homozygoten Zwillingen). Wo innerhalb des Genoms allerdings diese Regionen lokalisiert sind, die die Expression regulieren könnten (sogenannte ECEs, *expression controlling elements*), ist noch nicht vollständig geklärt. Diskutiert werden die Regulation durch klassische Transkriptionsfaktoren oder die Möglichkeit der Regulation durch Sequenzen in der 3'-untranslatierten Region, die die Stabilität des Transkripts beeinflussen - beide Mechanismen sind bereits aus Studien an Mikroorganismen bekannt¹⁴⁶.

Es erscheint daher sinnvoll, auch Polymorphismen in regulatorischen Einheiten pathomorphologisch relevanter Genorte auf eine genetische Assoziation zu untersuchen.

Perspektiven

Die Untersuchung genetischer Risikomarker für die autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen Hashimoto Thyreoiditis und Morbus Basedow kann auf weitere Gene ausgeweitet werden, die speziell im Rahmen der lokalen Immunantwort von funktioneller Relevanz sind. In Frage kommen hierbei die bereits genannten Kandidaten aus dem Bereich der Zyto- und Chemokine, weitere pro- und anti-apoptotische Proteine und genmodulatorische Elemente.

Auch durch Identifikation und Assoziationsanalyse organspezifisch exprimierter Proteine können weitere Risikomarker charakterisiert werden. So konnte beispielsweise in einer japanischen¹²¹ und einer amerikanischen¹⁴⁷ Studie eine starke Kopplung zu einer Region auf Chromosom 8, die auch für das Thyroglobulin-Gen codiert, nachgewiesen werden. Möglicherweise liegt in dieser Region ein weiterer wichtiger Locus für autoimmune Schilddrüsenerkrankungen.

Schließlich könnte die Identifizierung von Überträgern genetischer Erkrankung auch ohne die Kenntnis assoziierter Genpolymorphismen möglich werden. Durch die Evaluation der Expressionsmuster verschiedener Gene, die nicht zwingend mit der jeweiligen Pathogenese in Verbindung stehen müssen, erfolgt die Charakterisierung eines Risikoprofils. Gezeigt werden konnte dies am Beispiel der Ataxia teleangiectasia¹⁴⁸. Anhand von nur vier Genen, deren Expression deutliche Unterschiede zwischen Trägern und gesunden Probanden aufwies, konnten 95% der getesteten Personen korrekt der jeweiligen Gruppe zugeordnet werden. Denkbar ist, dass die genetische Prädisposition für Erkrankungen einer bestimmten

pathophysiologischen Einheit, beispielsweise maligne Erkrankungen, Autoimmunkrankheiten oder kardiovaskuläre Erkrankungen, dann entsteht, wenn ein Individuum heterozygoter Träger mehrerer rezessiv vererbter Risikogene ist. Im Umkehrschluß könnte daher in Zukunft die Charakterisierung multifaktoriell vererbter Krankheiten durch ein Screening einer Querschnitts-Population auf hoch variable Expressions-Phänotypen und deren anschließende Korrelation mit genetischen Determinanten erfolgen.

Über die genetischen Assoziationsanalysen hinaus steht weiterhin die Beantwortung wichtiger Fragen sowohl im Bereich des programmierten Zelltods als auch der spezifischen Immunantwort zum Verständnis des Pathomechanismus der Schilddrüsenautoimmunität aus:

Durch zahlreiche Studien konnte die Regulation des programmierten Zelltods in diversen pathologischen Milieus charakterisiert werden. Allerdings ist die Regulation von Fas/FasL- und TRAIL-Expression auf gesunden Thyreozyten sowie ihre physiologische Rolle in der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase noch nicht endgültig geklärt.

Auch ist eine mögliche Involvierung von T_S-Zellen, die über eine Freisetzung von IL-10 und TGF- β anti-inflammatorisch und anti-apoptotisch wirken könnten, im Rahmen autoimmuner Schilddrüsenerkrankungen nicht ausreichend untersucht.

Zu wenig ist bisher auch über die Auswirkungen einer lokalen oder systemischen Immunmodulation bekannt, beispielsweise durch die Stimulation einer vorwiegend TH1- bzw. TH2-vermittelten Immunantwort. Diese Fragen sind nicht nur im Hinblick auf systemische und organspezifische Autoimmunerkrankungen sondern auch auf chronische Virusinfektionen oder die Tumor-Genese bedeutsam.

Zur Entwicklung eines kurativen Therapieansatzes für autoimmune Schilddrüsenerkrankungen im Sinne einer Intervention des immunologischen oder apoptotischen Gleichgewichts werden diese Erkenntnisse von grundlegender Bedeutung sein.

6) Zusammenfassung

Apoptose ist ein gemeinsamer Pathomechanismus vieler Autoimmunerkrankungen, so auch im Rahmen der Schilddrüsenautoimmunerkrankungen, deren häufigste Hashimoto Thyreoiditis und Morbus Basedow (Graves' disease) darstellen. Während eine gesteigerte Apoptoserate der Schilddrüsenzellen bei Hashimoto Thyreoiditis zur Entwicklung einer Hypothyreose führt, sind es bei Morbus Basedow die infiltrierenden Lymphozyten, die durch Apoptose zu Grunde gehen, während die Schilddrüsenzellen unter dem protektiven Einfluß anti-apoptotischer Signale proliferieren können.

Der zu Grunde liegende Pathomechanismus wird in der Reifung und Aktivierung des Immunsystems angenommen. Einige potentielle Ursachen sind eine insuffiziente systemische Elimination autoreaktiver Lymphozyten im Rahmen der positiven und negativen Selektion im Thymus, ein Versagen der peripheren *immunological ignorance*, oder eine inadäquate Aktivierung von Lymphozyten in einem pro-inflammatorischen Milieu. All diese Mechanismen können durch eine inadäquate Apoptose ausgelöst oder verstärkt werden.

Die Fas/FasL-induzierte Kaskade ist einer der Haupt-Signalwege in der Apoptose-Induktion. Seine Bedeutung im Rahmen von Autoimmunerkrankungen ist vielfach untersucht, und eine Assoziation genetischer Polymorphismen in Fas und seinem Liganden wurde bereits für einige organspezifische und generalisierte Erkrankungen gezeigt (Typ I Diabetes, Multiple Sklerose, Rheumatoide Arthritis u.a.).

Das genetisch vermittelte Risiko dieser Erkrankungen wird bisher vor allem der HLA DQ-Region und Polymorphismen im CTLA-4-Gen zugeschrieben. Aufgrund der funktionellen Relevanz der Fas/FasL-vermittelten Apoptose im Rahmen autoimmuner Schilddrüsen-erkrankungen wurden im Rahmen dieser Arbeit Kandidatengene untersucht, die von funktioneller Relevanz für die Entstehung autoimmuner Schilddrüsen-erkrankungen sind: die Apoptose-regulierenden Faktoren Fas, FasL und Bcl-2.

209 Familien kaukasischen Ursprungs mit insgesamt 730 Individuen, bei denen mindestens eines der Kinder an Hashimoto Thyreoiditis (n = 100) oder an Morbus Basedow (n = 109) erkrankt war, wurden genotypisiert auf zwei Polymorphismen des Fas-Gens (g-670 G-A in der Promotorregion, g-154 C-T in Exon 7), drei FasL Genpolymorphismen (C -843 T und EBP im Promotor, A IVS2nt-124 G in Intron 2) und ein Polymorphismus im Bcl-2-Gen.

Nach Durchführung einer indirekten Haplotypisierung, Chi²- and Extended Transmission Disequilibrium-Test waren weder einzelne Fas- bzw. FasL-Polymorphismen noch kombinierte Haplotypen mit Hashimoto Thyroiditis oder Morbus Basedow assoziiert. Bei der Analyse des Bcl-2 Polymorphismus ergab sich eine Tendenz zu einer Assoziation des G-Allels mit beiden Thyreopathien. Subgruppen-Analysen (männliche vs. weibliche Patienten, CTLA-4-Genotypen, DQ-Haplotypen) ergaben keinen weiteren Informationsgehalt, die Daten italienischer und deutscher Familien unterschieden sich ebenfalls nicht.

Zusammenfassend ergeben die Daten keinen signifikanten Beitrag der untersuchten Varianten in Bcl-2, Fas oder FasL zum genetischen Risiko autoimmuner Schilddrüsen-erkrankungen.

Zur Entwicklung möglicher diagnostischer und therapeutischer Optionen für autoimmune Schilddrüsen-erkrankungen wird die Untersuchung weiterer funktionell bedeutsamer Regulatoren der apoptotischen Signaltransduktionswege von Bedeutung sein.

Abstract

Apoptosis is a joint pathogenic process underlying autoimmune thyroid disease. Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease represent the two most common autoimmune thyroid disorders. Increased programmed cell death in thyrocytes causes hypothyroidism in Hashimoto's thyroiditis, whereas in Graves' disease infiltrating lymphocytes undergo apoptosis while thyrocytes appear to proliferate under protection of anti-apoptotic signals. Some of the potential mechanisms of disease are insufficient systemic elimination of autoreactive lymphocytes during positive and negative selection in the thymus, breakdown of immunological ignorance, or inadequate local activation and proliferation in a pro-inflammatory environment. All of these can be provoked or amplified through lack or overdrive of apoptosis.

The Fas/Fas ligand cascade represents a major pathway initiating apoptosis. Its role in autoimmunity is well studied and genetic polymorphisms in gene loci of Fas and its ligand have been shown to be associated with autoimmune diseases such as Type I Diabetes, Multiple Sclerosis, Rheumatoid Arthritis and others.

Given the functional relevance of the Fas/FasL pathway in autoimmune thyroid disease, this work investigated the possible contribution of polymorphisms in functionally relevant genes (Fas, FasL, Bcl-2) to the genetic risk of thyroid autoimmunity, which so far is mainly, but incompletely, attributed to the HLA DQ region and polymorphisms in the CTLA-4 gene.

209 Caucasian families comprising 730 individuals with at least one offspring affected by Hashimoto's thyroiditis (n = 100) and Graves' disease (n = 109) were genotyped for two Fas gene polymorphisms (g-670 G / A in the promoter region, g-154 C / T in exon 7), three FasL gene polymorphisms (C -843 T and EBP in the promoter, A IVS2nt-124 G in intron 2) and one polymorphism in the Bcl-2 gene.

Indirect haplotyping, χ^2 and extended transmission disequilibrium testing were performed. Neither FasL polymorphism alone nor the promoter/exon 7 haplotypes were associated with Hashimoto's thyroiditis or Graves' disease. Neither polymorphism alone nor the promoter/intron02 haplotypes encoded in the Fas gene were associated with Hashimoto's thyroiditis or Graves' disease. The Bcl-2 polymorphism showed a tendency toward an association of the G-allele with both thyreopathies.

Subgroup analyses (male vs. female patients, CTLA-4-genotypes, DQ-haplotypes) did not reveal any further information. Italian and German families did not differ for the studied polymorphisms.

In summary, the data do not suggest any significant contribution of common genetic Bcl-2, Fas or FasL variants to the genetic risk of developing Hashimoto's thyreoiditis or Graves' disease.

Nevertheless, the functional relevance of this and other regulators of apoptotic pathways in emergence and maintenance of the inflammatory process and tissue destruction in thyroid autoimmune disorders warrants further studies to develop future therapeutic options.

7) Literatur

1. Saikumar,P. *et al.* Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med JID - 0267200* **107**, 489-506 (1999).
2. Kerr,J.F., Wyllie,A.H. & Currie,A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257 (1972).
3. Loo,D.T. & Rillema,J.R. Measurement of cell death. *Methods Cell Biol.* **57:251-64.**, 251-264 (1998).
4. McCarthy,N.J. & Evan,G.I. Methods for detecting and quantifying apoptosis. *Curr. Top. Dev. Biol.* **36:259-78.**, 259-278 (1998).
5. Gordon,N. Apoptosis (programmed cell death) and other reasons for elimination of neurons and axons. *Brain Dev.* **17**, 73-77 (1995).
6. Clarke,P.G., Posada,A., Primi,M.P. & Castagne,V. Neuronal death in the central nervous system during development. *Biomed. Pharmacother.* **52**, 356-362 (1998).
7. Strange,R., Friis,R.R., Bemis,L.T. & Geske,F.J. Programmed cell death during mammary gland involution. *Methods Cell Biol.* **46:355-68.**, 355-368 (1995).
8. Kokawa,K., Shikone,T. & Nakano,R. Apoptosis in the human uterine endometrium during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 4144-4147 (1996).
9. Sendo,F. *et al.* Regulation of neutrophil apoptosis--its biological significance in inflammation and the immune response. *Hum. Cell.* **9**, 215-222 (1996).
10. King,L.B. & Ashwell,J.D. Thymocyte and T cell apoptosis: is all death created equal? *Thymus.* **23**, 209-230 (1994).
11. Geng,Y.J. Regulation of programmed cell death or apoptosis in atherosclerosis. *Heart Vessels.* **Suppl 12:76-80.**, 76-80 (1997).
12. Rubin,L.L. Neuronal cell death: when, why and how. *Br. Med. Bull.* **53**, 617-631 (1997).
13. Jenner,P. & Olanow,C.W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology.* **47**, S161-S170 (1996).
14. Jellinger,K.A. & Bancher,C. Neuropathology of Alzheimer's disease: a critical update. *J. Neural Transm. Suppl.* **54:77-95.**, 77-95 (1998).

15. O'Connell,J., Bennett,M.W., O'Sullivan,G.C., Collins,J.K. & Shanahan,F. Fas counter-attack--the best form of tumor defense? *Nat. Med.* **5**, 267-268 (1999).
16. Mitsiades,N., Poulaki,V., Kotoula,V., Leone,A. & Tsokos,M. Fas ligand is present in tumors of the Ewing's sarcoma family and is cleaved into a soluble form by a metalloproteinase. *Am. J. Pathol.* **153**, 1947-1956 (1998).
17. Kalams,S.A. & Walker,B.D. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* **188**, 2199-2204 (1998).
18. Ellis,H.M. & Horvitz,H.R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell.* **44**, 817-829 (1986).
19. Vaux,D.L. & Strasser,A. The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 2239-2244 (1996).
20. Boldin,M.P. *et al.* A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* **270**, 7795-7798 (1995).
21. Alnemri,E.S. *et al.* Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* **87**, 171 (1996).
22. Sun,X.M. *et al.* Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**, 5053-5060 (1999).
23. Schulze-Osthoff,K., Ferrari,D., Los,M., Wesselborg,S. & Peter,M.E. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* **254**, 439-459 (1998).
24. French,L.E. & Tschopp,J. Constitutive Fas ligand expression in several non-lymphoid mouse tissues: implications for immune-protection and cell turnover. *Behring Inst. Mitt.* 156-160 (1996).
25. Nagata,S. Apoptosis by death factor. *Cell.* **88**, 355-365 (1997).
26. Muzio,M., Stockwell,B.R., Stennicke,H.R., Salvesen,G.S. & Dixit,V.M. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* **273**, 2926-2930 (1998).
27. Salvesen,G.S. & Dixit,V.M. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10964-10967 (1999).
28. Widmann,C., Gibson,S. & Johnson,G.L. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J. Biol. Chem.* **273**, 7141-7147 (1998).
29. Cheng,E.H. *et al.* Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science.* **278**, 1966-1968 (1997).

30. Imai, Y. *et al.* The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature*. **398**, 777-785 (1999).
31. Irmeler, M. *et al.* Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. **388**, 190-195 (1997).
32. Thome, M. *et al.* Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*. **386**, 517-521 (1997).
33. Refaeli, Y., Van Parijs, L., London, C.A., Tschopp, J. & Abbas, A.K. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity*. **8**, 615-623 (1998).
34. Memon, S.A., Moreno, M.B., Petrak, D. & Zacharchuk, C.M. Bcl-2 blocks glucocorticoid- but not Fas- or activation-induced apoptosis in a T cell hybridoma. *J. Immunol.* **155**, 4644-4652 (1995).
35. Flomerfelt, F.A. & Miesfeld, R.L. Recessive mutations in a common pathway block thymocyte apoptosis induced by multiple signals. *J. Cell Biol.* **127**, 1729-1742 (1994).
36. Saikumar, P. *et al.* Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury. *Oncogene*. **17**, 3401-3415 (1998).
37. Zhong, L.T. *et al.* bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 4533-4537 (1993).
38. Strasser, A., Harris, A.W., Huang, D.C., Krammer, P.H. & Cory, S. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J* **14**, 6136-6147 (1995).
39. Itoh, N., Tsujimoto, Y. & Nagata, S. Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J. Immunol.* **151**, 621-627 (1993).
40. Opferman, J.T. & Korsmeyer, S.J. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat. Immunol.* **4**, 410-415 (2003).
41. Dianzani, U., Chiochetti, A. & Ramenghi, U. Role of inherited defects decreasing Fas function in autoimmunity. *Life Sci.* **72**, 2803-2824 (2003).
42. Ahmed, R. & Gray, D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science*. **272**, 54-60 (1996).
43. Davies, J.L. *et al.* A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* **371**, 130-136 (1994).
44. Boise, L.H. *et al.* CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity*. **3**, 87-98 (1995).

45. Baird,A.M., Gerstein,R.M. & Berg,L.J. The role of cytokine receptor signaling in lymphocyte development. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 157-166 (1999).
46. Akbar,A.N. *et al.* Interleukin-2 receptor common gamma-chain signaling cytokines regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-xL) but not pro-apoptotic (bax, bcl-xS) gene expression. *Eur. J. Immunol.* **26**, 294-299 (1996).
47. Freedden-Jeffry,U., Solvason,N., Howard,M. & Murray,R. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity.* **7**, 147-154 (1997).
48. Djeu,J.Y., Jiang,K. & Wei,S. A view to a kill: signals triggering cytotoxicity. *Clin. Cancer Res.* **8**, 636-640 (2002).
49. Blink,E.J., Trapani,J.A. & Jans,D.A. Perforin-dependent nuclear targeting of granzymes: A central role in the nuclear events of granule-exocytosis-mediated apoptosis? *Immunol. Cell Biol.* **77**, 206-215 (1999).
50. Mackay,I.R. Science, medicine, and the future: Tolerance and autoimmunity. *BMJ JID - 8900488* **321**, 93-96 (2000).
51. Baker,J.R., Jr. Autoimmune endocrine disease. *JAMA* **278**, 1931-1937 (1997).
52. Strieder,T.G., Prummel,M.F., Tijssen,J.G., Endert,E. & Wiersinga,W.M. Risk factors for and prevalence of thyroid disorders in a cross-sectional study among healthy female relatives of patients with autoimmune thyroid disease. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **59**, 396-401 (2003).
53. Matos-Santos,A. *et al.* Relationship between the number and impact of stressful life events and the onset of Graves' disease and toxic nodular goitre. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **55**, 15-19 (2001).
54. Prummel,M.F. & Wiersinga,W.M. Smoking and risk of Graves' disease. *JAMA* **269**, 479-482 (1993).
55. Wucherpfennig,K.W. & Strominger,J.L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell.* **80**, 695-705 (1995).
56. Olson,J.K., Croxford,J.L., Calenoff,M.A., Dal Canto,M.C. & Miller,S.D. A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* **108**, 311-318 (2001).
57. Lehmann,P.V., Forsthuber,T., Miller,A. & Sercarz,E.E. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature.* **358**, 155-157 (1992).

58. Kamradt,T. & Mitchison,N.A. Tolerance and autoimmunity. *New England Journal of Medicine* **344**, 655-664 (2001).
59. Batteux,F., Tourneur,L., Trebeden,H., Charreire,J. & Chiocchia,G. Gene therapy of experimental autoimmune thyroiditis by in vivo administration of plasmid DNA coding for Fas ligand. *J Immunol JID - 2985117R* **162**, 603-608 (1999).
60. Canaris,G.J., Manowitz,N.R., Mayor,G. & Ridgway,E.C. The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch. Intern. Med.* **160**, 526-534 (2000).
61. Tunbridge,W.M. *et al.* The spectrum of thyroid disease in a community: the Whickham survey. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **7**, 481-493 (1977).
62. Hollowell,J.G. *et al.* Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 489-499 (2002).
63. Laurberg,P. *et al.* Iodine intake and the pattern of thyroid disorders: a comparative epidemiological study of thyroid abnormalities in the elderly in Iceland and in Jutland, Denmark. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 765-769 (1998).
64. Fukata,S., Kuma,K. & Sugawara,M. Relationship between cigarette smoking and hypothyroidism in patients with Hashimoto's thyroiditis. *J. Endocrinol. Invest.* **19**, 607-612 (1996).
65. Thompson,C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. **267**, 1456-1462 (1995).
66. Jacobsen,M. *et al.* A point mutation in PTPRC is associated with the development of multiple sclerosis. *Nat. Genet.* **26**, 495-499 (2000).
67. Kung,C. *et al.* Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease. *Nat. Med.* **6**, 343-345 (2000).
68. Tivol,E.A. *et al.* Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. **3**, 541-547 (1995).
69. Haux,J. *et al.* The role of interleukin-2 in regulating the sensitivity of natural killer cells for Fas-mediated apoptosis. *Cancer Immunol. Immunother.* **48**, 139-146 (1999).
70. O'Flaherty,E. *et al.* Regulation of T-cell apoptosis: a mixed lymphocyte reaction model. *Immunology*. **100**, 289-299 (2000).
71. Chun,H.J. *et al.* Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature*. **419**, 395-399 (2002).

72. Wang,J. *et al.* Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell.* **98**, 47-58 (1999).
73. Jackson,C.E. *et al.* Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 1002-1014 (1999).
74. Straus,S.E., Sneller,M., Lenardo,M.J., Puck,J.M. & Strober,W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann. Intern. Med.* **130**, 591-601 (1999).
75. Mitsiades,N., Poulaki,V., Mitsiades,C.S., Koutras,D.A. & Chrousos,G.P. Apoptosis induced by FasL and TRAIL/Apo2L in the pathogenesis of thyroid diseases. *Trends Endocrinol. Metab* **12**, 384-390 (2001).
76. Mitsiades,N., Poulaki,V., Mitsiades,C.S., Koutras,D.A. & Chrousos,G.P. Apoptosis induced by FasL and TRAIL/Apo2L in the pathogenesis of thyroid diseases. *Trends Endocrinol. Metab* **12**, 384-390 (2001).
77. Comi,C. *et al.* Defective T cell fas function in patients with multiple sclerosis. *Neurology.* **55**, 921-927 (2000).
78. Defranco,S. *et al.* Defective function of Fas in patients with type 1 diabetes associated with other autoimmune diseases. *Diabetes.* **50**, 483-488 (2001).
79. Veis,D.J., Sorenson,C.M., Shutter,J.R. & Korsmeyer,S.J. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell.* **75**, 229-240 (1993).
80. Bruckheimer,E.M. *et al.* Bcl-2 accelerates multistep prostate carcinogenesis in vivo. *Oncogene.* **19**, 5251-5258 (2000).
81. Arscott,P.L. & Baker,J.R., Jr. Apoptosis and thyroiditis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **87**, 207-217 (1998).
82. Andrikoula,M. & Tsatsoulis,A. The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid disease. *Eur. J. Endocrinol.* **144**, 561-568 (2001).
83. Giordano,C. *et al.* Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* **275**, 960-963 (1997).
84. Mitsiades,N. *et al.* Fas/Fas ligand up-regulation and Bcl-2 down-regulation may be significant in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab JID - 0375362* **83**, 2199-2203 (1998).

85. Hammond,L.J. *et al.* Analysis of apoptosis in relation to tissue destruction associated with Hashimoto's autoimmune thyroiditis. *J Pathol JID - 0204634* **182**, 138-144 (1997).
86. Mitsiades,N., Poulaki,V., Mitsiades,C.S., Koutras,D.A. & Chrousos,G.P. Apoptosis induced by FasL and TRAIL/Apo2L in the pathogenesis of thyroid diseases. *Trends Endocrinol. Metab* **12**, 384-390 (2001).
87. Borgerson,K.L., Bretz,J.D. & Baker,J.R.J. The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid autoimmune disease. *Autoimmunity JID - 8900070* **30**, 251-264 (1999).
88. Stassi,G. & De Maria,R. Autoimmune thyroid disease: new models of cell death in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 195-204 (2002).
89. Arscott,P.L. *et al.* Fas (APO-1, CD95)-mediated apoptosis in thyroid cells is regulated by a labile protein inhibitor. *Endocrinology JID - 0375040* **138**, 5019-5027 (1997).
90. Kong,Y.C. *et al.* HLA-DRB1 polymorphism determines susceptibility to autoimmune thyroiditis in transgenic mice: definitive association with HLA-DRB1*0301 (DR3) gene. *J. Exp. Med.* **184**, 1167-1172 (1996).
91. Silverman,D. & Rose,N.R. Spontaneous and methylcholanthrene-enhanced thyroiditis in BUF rats. II. Induction of experimental autoimmune thyroiditis without completed Freund's adjuvant. *J. Immunol.* **114**, 148-150 (1975).
92. Kotani,T. *et al.* Apoptosis in thyroid tissue from patients with Hashimoto's thyroiditis. *Autoimmunity* **20**, 231-236 (1995).
93. Kabel,P.J. *et al.* A diminished adherence of blood lymphocytes of patients with thyroid autoimmune disease to high endothelial venules in the thyroid and the thyroid-draining lymph nodes. *Autoimmunity* **5**, 247-256 (1990).
94. Kuhr,T., Hala,K., Dietrich,H., Herold,M. & Wick,G. Genetically determined target organ susceptibility in the pathogenesis of spontaneous autoimmune thyroiditis: aberrant expression of MHC-class II antigens and the possible role of virus. *J. Autoimmun.* **7**, 13-25 (1994).
95. Watanabe,M. *et al.* Independent involvement of CD8+ CD25+ cells and thyroid autoantibodies in disease severity of Hashimoto's disease. *Thyroid.* **12**, 801-808 (2002).
96. Okosieme,O.E. *et al.* Complement activation in postpartum thyroiditis. *QJM.* **95**, 173-179 (2002).
97. Pearce,E.N., Farwell,A.P. & Braverman,L.E. Thyroiditis. *N. Engl. J. Med.* **348**, 2646-2655 (2003).

98. Weetman,A.P. & McGregor,A.M. Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocr. Rev.* **15**, 788-830 (1994).
99. Bretz,J.D., Arscott,P.L., Myc,A. & Baker,J.R.J. Inflammatory cytokine regulation of Fas-mediated apoptosis in thyroid follicular cells. *J Biol Chem JID - 2985121R* **274**, 25433-25438 (1999).
100. Stassi,G. *et al.* Control of target cell survival in thyroid autoimmunity by T helper cytokines via regulation of apoptotic proteins. *Nat Immunol JID - 100941354* **1**, 483-488 (2000).
101. Giordano,C. *et al.* Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* **275**, 960-963 (1997).
102. Batteux,F., Lores,P., Bucchini,D. & Chiochia,G. Transgenic expression of Fas ligand on thyroid follicular cells prevents autoimmune thyroiditis. *J Immunol JID - 2985117R* **164**, 1681-1688 (2000).
103. Giordano,C. *et al.* Thyrocytes--not innocent bystanders in autoimmune disease. *Nat Immunol JID - 100941354* **2**, 183-Giordano, C (2001).
104. Sanders,J. *et al.* Human monoclonal thyroid stimulating autoantibody. *Lancet* **362**, 126-128 (2003).
105. Tanimoto,C., Hirakawa,S., Kawasaki,H., Hayakawa,N. & Ota,Z. Apoptosis in thyroid diseases: a histochemical study. *Endocr. J.* **42**, 193-201 (1995).
106. Mitsiades,N., Poulaki,V., Mitsiades,C.S., Koutras,D.A. & Chrousos,G.P. Apoptosis induced by FasL and TRAIL/Apo2L in the pathogenesis of thyroid diseases. *Trends Endocrinol. Metab* **12**, 384-390 (2001).
107. Mitsiades,N., Poulaki,V., Tseleni-Balafouta,S., Chrousos,G.P. & Koutras,D.A. Fas ligand expression in thyroid follicular cells from patients with thionamide-treated Graves' disease. *Thyroid JID - 9104317* **10**, 527-532 (2000).
108. Brix,T.H., Kyvik,K.O., Christensen,K. & Hegedus,L. Evidence for a major role of heredity in Graves' disease: a population-based study of two Danish twin cohorts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 930-934 (2001).
109. Okayasu,I., Kong,Y.M. & Rose,N.R. Effect of castration and sex hormones on experimental autoimmune thyroiditis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **20**, 240-245 (1981).
110. Torfs,C.P., King,M.C., Huey,B., Malmgren,J. & Grumet,F.C. Genetic interrelationship between insulin-dependent diabetes mellitus, the autoimmune thyroid diseases, and rheumatoid arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* **38**, 170-187 (1986).

111. Grumet,F.C., Payne,R.O., Konishi,J. & Kriss,J.P. HL-A antigens as markers for disease susceptibility and autoimmunity in Graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **39**, 1115-1119 (1974).
112. Farid,N.R. *et al.* A study of human leukocyte D locus related antigens in Graves' disease. *J. Clin. Invest.* **63**, 108-113 (1979).
113. Gough,S.C. The genetics of Graves' disease. *Endocrinol. Metab Clin. North Am.* **29**, 255-266 (2000).
114. Yanagawa,T. *et al.* Human histocompatibility leukocyte antigen-DQA1*0501 allele associated with genetic susceptibility to Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab JID - 0375362* **76**, 1569-1574 (1993).
115. Philippou,G. *et al.* HLA DQA1*0501 and DRB1*0301 antigens do not independently convey susceptibility to Graves' disease. *J. Endocrinol. Invest.* **24**, 88-91 (2001).
116. Ratanachaiyavong,S., Demaine,A.G., Campbell,R.D. & McGregor,A.M. Heat shock protein 70 (HSP70) and complement C4 genotypes in patients with hyperthyroid Graves' disease. *Clin. Exp. Immunol.* **84**, 48-52 (1991).
117. Badenhoop,K. *et al.* Tumor necrosis factor beta gene polymorphisms in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab JID - 0375362* **74**, 287-291 (1992).
118. Heward,J.M. *et al.* Linkage disequilibrium between the human leukocyte antigen class II region of the major histocompatibility complex and Graves' disease: replication using a population case control and family-based study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 3394-3397 (1998).
119. Vaidya,B. *et al.* The cytotoxic T lymphocyte antigen-4 is a major Graves' disease locus. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1195-1199 (1999).
120. Tomer,Y., Barbesino,G., Greenberg,D.A., Concepcion,E. & Davies,T.F. Mapping the major susceptibility loci for familial Graves' and Hashimoto's diseases: evidence for genetic heterogeneity and gene interactions. *J Clin Endocrinol Metab JID - 0375362* **84**, 4656-4664 (1999).
121. Sakai,K. *et al.* Identification of susceptibility loci for autoimmune thyroid disease to 5q31-q33 and Hashimoto's thyroiditis to 8q23-q24 by multipoint affected sib-pair linkage analysis in Japanese. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1379-1386 (2001).
122. Ligers,A., Teleshova,N., Masterman,T., Huang,W.X. & Hillert,J. CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. *Genes Immun.* **2**, 145-152 (2001).
123. Donner,H. *et al.* CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab JID - 0375362* **82**, 143-146 (1997).

124. Heward,J.M. *et al.* The development of Graves' disease and the CTLA-4 gene on chromosome 2q33. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 2398-2401 (1999).
125. Yanagawa,T., Hidaka,Y., Guimaraes,V., Soliman,M. & DeGroot,L.J. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab JID - 0375362* **80**, 41-45 (1995).
126. Nithiyananthan,R., Heward,J.M., Allahabadia,A., Franklyn,J.A. & Gough,S.C. Polymorphism of the CTLA-4 gene is associated with autoimmune hypothyroidism in the United Kingdom. *Thyroid.* **12**, 3-6 (2002).
127. Rust,S., Funke,H. & Assmann,G. Mutagenically separated PCR (MS-PCR): a highly specific one step procedure for easy mutation detection. *Nucleic Acids Research* **21**, 3623-3629 (1993).
128. Kagi,D. *et al.* Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* **265**, 528-530 (1994).
129. Ferguson,T.A., Green,D.R. & Griffith,T.S. Cell death and immune privilege. *Int Rev. Immunol.* **21**, 153-172 (2002).
130. Barker,C.F. & Billingham,R.E. Immunologically privileged sites. *Adv. Immunol.* **25:1-54.**, 1-54 (1977).
131. Bechmann,I. *et al.* FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia* **27**, 62-74 (1999).
132. Batteux,F., Lores,P., Bucchini,D. & Chiochia,G. Transgenic expression of Fas ligand on thyroid follicular cells prevents autoimmune thyroiditis. *J Immunol* **164**, 1681-1688 (2000).
133. Giordano,C. *et al.* Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science JID - 0404511* **275**, 960-963 (1997).
134. Hiromatsu,Y. *et al.* Functional Fas ligand expression in thyrocytes from patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab JID - 0375362* **84**, 2896-2902 (1999).
135. Hiromatsu,Y. *et al.* Functional Fas ligand expression in thyrocytes from patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 2896-2902 (1999).
136. Mitsiades,N. *et al.* Fas ligand expression in thyroid carcinomas: a potential mechanism of immune evasion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **84**, 2924-2932 (1999).
137. Bretz,J.D. *et al.* TRAIL death pathway expression and induction in thyroid follicular cells. *J Biol Chem JID - 2985121R* **274**, 23627-23632 (1999).

138. Van Parijs,L. *et al.* Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. *Immunity*. **11**, 281-288 (1999).
139. Hall,R., SAXENA,K.M. & Owen,S.G. A study of the parents of patients with Hashimoto's disease. *Lancet*. **2:1291-2**, 1291-1292 (1962).
140. Monzani,F., Caraccio,N., Dardano,A. & Ferrannini,E. Thyroid autoimmunity and dysfunction associated with type I interferon therapy. *Clin. Exp. Med.* **3**, 199-210 (2004).
141. Marazuela,M. *et al.* Thyroid autoimmune disorders in patients with chronic hepatitis C before and during interferon-alpha therapy. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **44**, 635-642 (1996).
142. Atkins,M.B. *et al.* Hypothyroidism after treatment with interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells. *N. Engl. J. Med.* **318**, 1557-1563 (1988).
143. Jin,W. *et al.* The contributions of sex, genotype and age to transcriptional variance in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* **29**, 389-395 (2001).
144. Sandberg,R. *et al.* Regional and strain-specific gene expression mapping in the adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 11038-11043 (2000).
145. Cheung,V.G. *et al.* Natural variation in human gene expression assessed in lymphoblastoid cells. *Nat. Genet.* **33**, 422-425 (2003).
146. Brem,R.B., Yvert,G., Clinton,R. & Kruglyak,L. Genetic dissection of transcriptional regulation in budding yeast. *Science*. **296**, 752-755 (2002).
147. Tomer,Y., Greenberg,D.A., Concepcion,E., Ban,Y. & Davies,T.F. Thyroglobulin is a thyroid specific gene for the familial autoimmune thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab JID - 0375362* **87**, 404 (2002).
148. Watts,J.A. *et al.* Gene expression phenotype in heterozygous carriers of ataxia telangiectasia. *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 791-800 (2002).

8) Abbildungen und Tabellen

8.1) Abbildungs-Verzeichnis

Abbildung 1: Mitochondrien- und Caspasen-vermittelte Apoptose-Signalwege. Aus: Opfermann JT et al; Apoptosis in the development and maintenance of the Immune System, Nature Immunology; 4(5):410-15.....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der lymphozytären Infiltration bei Hashimoto Thyreoiditis.....	19
Abbildung 3: Chromosomale Lokalisation der Polymorphismen des Fas-Gens.....	35
Abbildung 4: Chromosomale Lokalisation der Polymorphismen des FasL-Gens.....	36
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der MS-PCR mit linearem Anstieg der Zahl der unverändert amplifizierten Stränge und exponentieller Vermehrung der mutierten Stränge.....	38
Abbildung 6: Fas Promoter (A-670G).....	43
Abbildung 7: Fas Exon 07.....	43
Abbildung 8: FasL Promoter (C-843T).....	44
Abbildung 9: FasL Intron 02.....	44
Abbildung 10: FasL EBP.....	44
Abbildung 11: Trennbereiche der Agarose-Gel-Elektrophorese.....	45
Abbildung 12: SSCP des Bcl-2 Polymorphismus.....	46
Abbildung 13: Trennbereiche der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	47
Abbildung 14: Indirekte Haplotypisierung anhand der Stammbaumanalyse.....	47

8.2) Tabellen-Verzeichnis

Tabelle 1: Charakteristika von Th1- und Th2-Zellen Nach: Weetman PA, Clin Endocrinol 2004; 61(4):405-13.....	8
Tabelle 2: Klassifizierung der Autoimmunerkrankungen.....	10
Tabelle 3: Phänotypische Charakteristika von Hashimoto Thyreoiditis und Morbus Basedow Nach: Fountoulakis S et al; Clin Endocrinol 2004; 60(4): 397-409.....	20
Tabelle 4: Assoziationsstudien zu HLA bei Hashimoto Thyreoiditis und Morbus Basedow in der Übersicht. Aus: Simmonds, MJ and Gough SCL, Unravelling the genetic complexity of autoimmune thyroid disease: HLA, CTLA-4 and beyond, Clin Exp Immuno 2004; 136:1-10.....	24
Tabelle 5 Assoziationsstudien zu CTLA-4 bei Hashimoto Thyreoiditis und Morbus Basedow in der Übersicht. Aus: Simmonds, MJ and Gough SCL, Unravelling the genetic complexity of autoimmune thyroid disease: HLA, CTLA-4 and beyond, Clin Exp Immuno 2004; 136:1-10.....	25

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Bettina Johanna Stuck
Adresse	Ferdinand-Dirichs-Weg 84 D – 60529 Frankfurt
Geburtsdatum	03.04.1979
Geburtsort	Frankfurt am Main
Familienstand	Ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Geburtsort	Frankfurt am Main
Eltern	Roswitha Stuck, geb. Sack, Bankkauffrau Bernhard Alois Stuck, Dipl.-Ingenieur

Ausbildung

1986-1989	Minna-Specht-Schule, Frankfurt
1989-1998	Carl-Schurz-Gymnasium, Frankfurt
1998	Abitur, Note 1,3
1998-2003	Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt
2001	Aufnahme in das Stipendienprogramm des Cusanuswerks
2002	Forschungssemester an der Harvard-Universität, Boston, USA
2003-2004	Studium der Humanmedizin an der Humboldt-Universität, Berlin
2004	Staatsexamen und Approbation, Gesamtnote: gut (1,99)
Seit 2005	Assistenzärztin der Klinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum des Saarlandes

Frankfurt am Main, den 29.08.2006

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Apoptose und Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen:
Genetische Polymorphismen in Fas, Fas Ligand und Bcl-2“**

im Zentrum für Innere Medizin I unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Badenhoop und der Betreuung durch Dr. M. Pani ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

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.

Die vorliegende Arbeit wurde in den folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

European Journal of Endocrinology 2003; 149:393-396
Human Immunology 2003; 64(2):285-9

Frankfurt am Main, den 29.08.2006

