

Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Funktionsbereich Endokrinologie

Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schott

**Thyreoglobulin und Thyreoperoxidase**  
Epitop-spezifische zelluläre Immunität  
bei der Hashimoto-Thyreoiditis

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dominika Katharina Porwol

2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Schott  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Müller

„Inmitten der Schwierigkeiten liegt die Möglichkeit.“

(Albert Einstein)

Meinen Eltern und Großeltern  
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Teile dieser Doktorarbeit wurden veröffentlicht:

Margret Ehlers, Annette Thiel, Christian Bernecker, Dominika Porwol, Claudia Papewalis, Holger S. Willenberg, Sven Schinner, Hubertus Hautzel, Werner A. Scherbaum, Matthias Schott. Evidence of a combined cytotoxic thyroglobulin and Thyroperoxidase epitope-specific cellular immunity in Hashimoto's thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012 Apr;97(4):1347–54.

## Abkürzungen

AIT	Autoimmunthyreoiditis
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin (FACS-Fluoreszenz)
APC	Antigen-präsentierende Zellen
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CLIP	<i>Class II-associated invariant chain peptide</i>
CPT	<i>Cell Preparation Tubes</i>
CTLA4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
DC	Dendritische Zellen
DIT	Dijodtyrosin
EAE	Experimentelle autoimmune Encephalomyelitis
EAT	Experimentelle Autoimmunthyreoiditis
ED	Erstdiagnose
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCR	<i>fragment crystallizable receptor</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanate (FACS-Fluoreszenz)
FSC	<i>Forward Scatter</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HT	Hashimoto-Thyreoiditis
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IFN	Interferon
IGF I	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MACS	<i>Magnetic Activating Cell Sorting</i>
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIT	Monoiodotyrosin
MO	Monozyten
NOD	<i>Nonobese Diabetic</i> (Mäuse)
Pax8	<i>Paired-Box-Protein 8</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PD1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PE	Phycoerythrin (FACS-Fluoreszenz)
PI	Propidiumiodid
PS	Phosphatidylserin
PTPN22	<i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22</i>
rhIL	<i>recombinant human Interleukin</i>
RPMI	Zellmedium mit definierten Zusätzen (Material und Methoden)
rpm	<i>rounds per minute</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
SD	Schilddrüse

SSC	<i>Side Scatter</i>
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i>
Tc1	Zytotoxische T-Zelle Typ 1
Tg	Thyreoglobulin
TGF- $\beta$ 1	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th1	T-Helferzelle Typ 1
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	Thyreoperoxidase
TRAK	Thyreotropin-Rezeptor-Autoantikörper
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
TTF	Thyreoidaler Transkriptionsfaktor-1
TZR	T-Zell-Rezeptor
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
U	<i>Unit</i>

# Inhalt

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Hashimoto-Thyreoiditis .....	1
1.2 Die Antigene: Thyreoglobulin und Thyreoperoxidase .....	4
1.3 Die Kontrollgruppe: Strumapatienten .....	5
1.4 Human leukocyte antigens .....	6
1.5 Das Immunsystem und zytotoxische T-Zellen.....	9
1.6 Autoimmunität versus Toleranz.....	11
1.6.1 Epitope Spreading.....	13
1.6.2 Molekulares Mimikry .....	14
1.6.3 Bystander-Aktivierung („Zuschaueraktivierung“) .....	14
<b>2 ZIEL DER ARBEIT</b>	<b>16</b>
2.1 Problemstellung: das Hauptziel der Autoimmunität .....	16
2.2 Fragestellungen .....	16
2.3 Methodischer Ansatz.....	17
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>18</b>
3.1 Material .....	18
3.1.1 Geräte.....	18
3.1.2 Einmalmaterialien.....	19
3.1.3 Lösungen, Zusätze und Puffer .....	21
3.1.4 Zytokine .....	21
3.1.5 Einfrier- und Kulturmedien .....	22
3.1.6 Fluoreszenzantikörper und Nekrosefärbungen .....	23
3.1.7 Peptide und Tetramere (HLA-A2-restringiert) .....	24
3.1.8 Isolations-Kits .....	25
3.2 Patienten und Kontrollen.....	25
3.3 Spezimen: Vollblut und Schilddrüsenpunktat.....	26
3.3.1 Blutentnahme .....	26
3.3.2 Schilddrüsenpunktion .....	26
3.4 Methoden.....	27
3.4.1 Waschen und Zentrifugieren von Zellen .....	27
3.4.2 Kryokonservierung von Zellen .....	27

3.4.3	Bestimmung der Zellzahl.....	27
3.4.4	HLA-Typisierung der Spezimen.....	27
3.4.5	Durchflusszytometrie und Auswertung .....	28
3.4.6	Isolierung der peripheren mononukleären Zellen.....	29
3.4.7	Isolierung der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus PBMCs .....	30
3.4.8	Tetramerfärbung .....	32
3.4.9	Messung von TSH, Anti-TPO und Anti-Tg.....	35
3.4.10	Zytotoxizitätstest.....	35
3.4.11	Zellkultur für die Zytotoxizitätstests.....	37
3.5	Statistische Analyse .....	38
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>39</b>
4.1	Quantifizierung der TPO- und Tg-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im Blut: HT-Patienten vs. Kontrollgruppen.....	39
4.2	Quantifizierung der TPO- und Tg-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der Schilddrüse: HT-Patienten vs. Strumapatienten.....	41
4.3	Zusammenhang zwischen der Krankheitsdauer der Hashimoto-Thyreoiditis und der Anzahl der TPO- und Tg-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im Blut.....	43
4.4	Zusammenhang zwischen Autoantikörpern und TPO- und Tg-spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen bei Hashimoto-Patienten .....	45
4.5	Zytotoxizitätstest: Unterschiedliche epitopspezifische Lysekapazität von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus dem Blut von HT-Patienten .....	46
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>48</b>
5.1	Autoimmunes Hauptziel: TPO versus Tg .....	48
5.2	Anti-TPO und Anti-Tg: nur ein Epiphänomen?.....	50
5.3	HT: eine CD8 <sup>+</sup> T-Zell-vermittelte Erkrankung.....	52
5.4	Hashimoto-Krankheitsdauer und die autoreaktiven T-Zellen.....	53
<b>6</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR UND QUELLEN</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b>	<b>63</b>
8.1	Patienteninformation und Einverständniserklärung für HT-Patienten.....	63
8.2	Patienteninformation und Einverständniserklärung für Struma-Patienten.....	65



## Zusammenfassung

Die Hashimoto-Thyreoiditis (HT) ist eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen weltweit. Charakteristischerweise kommt es durch eine Schilddrüseninfiltration durch autoreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu einer Thyreozytenzerstörung und Hypothyreose sowie Autoantikörperproduktion. Die zytotoxischen T-Zellen richten sich gegen Epitope von den Schilddrüsenproteinen Thyreoglobulin (Tg) und Thyreoperoxidase (TPO). Nach aktueller Studienlage wird noch immer kontrovers diskutiert, welches der beiden Strukturen das autoimmune Hauptziel ist.

Ziel dieser Arbeit war, die Anzahl der TPO- und Tg-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut und in der Schilddrüse von HLA-A2<sup>+</sup> Hashimoto-Patienten zu quantifizieren und herauszufinden, welchen Zusammenhang diese zur Krankheitsdauer und zu den Serumautoantikörpern Anti-TPO und Anti-Tg haben. Dafür wurden die CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem peripheren Blut und aus Schilddrüsenpunktaten der Patienten isoliert, Tetramerfärbungen mit je drei TPO- und Tg-Epitopen durchgeführt und mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Kontrollgruppen bestanden aus HLA-A2<sup>-</sup> HT-Patienten, HLA-A2<sup>+</sup> Strumapatienten und HLA-A2<sup>+</sup> gesunden Personen (insgesamt 66 Studienteilnehmer).

Es konnte gezeigt werden, dass HT-Patienten signifikant erhöhte Anzahlen an TPO- und Tg-epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut sowie in der Schilddrüse haben, im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Dabei stellte sich keine signifikante Dominanz von Thyreoperoxidase oder Thyreoglobulin heraus. Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass es keinerlei Korrelation zwischen der Höhe der Serumautoantikörper Anti-TPO und Anti-Tg und der Anzahl der TPO- und Tg-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut von Hashimoto-Patienten gibt. Im Rahmen von Zytotoxizitätstests mithilfe von Annexin V/Propidiumiodid-Färbungen, wurden autoreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Monozyten von HLA-A2<sup>+</sup> HT-Patienten *in vitro* mit 6 verschiedenen Epitopen von Thyreoperoxidase und Thyreoglobulin (TPO 1-3 und Tg 1-3) Peptid-gepulst. Die höchste Lyserate konnte durch TPO3-gepulste Zellen sowie durch die Kombination aller Thyreoglobulin-Epitope (Tg 1+2+3) induziert werden. Ein weiteres Schlüsselergebnis der Arbeit ist, dass es mit steigender Krankheitsdauer der Hashimoto-Thyreoiditis zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl der epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen kommt, sodass Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als zehn Jahren hohe Anzahlen dieser autoreaktiven Zellen haben.

Die Ergebnisse veranschaulichen, dass sowohl Thyreoperoxidase als auch Thyreoglobulin eine sehr wichtige Rolle bei der Hashimoto-Thyreoiditis spielen, ohne dass eines dem anderen als Zielstruktur für autoreaktive T-Zellen überlegen ist. Sie scheinen gleichermaßen von Relevanz zu sein. Weiterhin lässt sich schlussfolgern, dass die humorale Immunantwort in Form von Anti-TPO- und Anti-Tg-Autoantikörpern keinerlei Zusammenhang zur zellulären Autoimmunantwort der CD8<sup>+</sup> T-Zellen hat, sodass diese voneinander unabhängige Komponenten der HT zu sein scheinen. Den Ergebnissen zufolge spielen die TPO- und Tg-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht nur bei der Initiation der Krankheit eine Rolle, sondern auch bei ihrem Progress, wie die steigenden Zellzahlen mit zunehmender Krankheitsdauer dargelegt haben.

Die Ergebnisse zeigen, dass Tg- und TPO-epitopspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen parallel bei der Hashimoto-Thyreoiditis entstehen und die Schilddrüse infiltrieren. Sie stellen gleichwertige Hauptziele der Autoimmunität dar.

# 1 EINLEITUNG

Über 30% aller organspezifischen Autoimmunkrankheiten betreffen die Schilddrüse (1). Die Hashimoto-Thyreoiditis, Morbus Basedow, Postpartum-Thyreoiditis, Schilddrüsen-assoziierte Ophthalmopathie und die schmerzlose/silente Thyreoiditis werden als Autoimmunthyreoiditis (AIT) zusammengefasst (2). Diese Schilddrüsenerkrankungen zeichnen sich allesamt durch eine Autoantikörperbildung gegen schilddrüsenspezifische Strukturen aus. Die drei Hauptziele sind Thyreoglobulin, Thyreoperoxidase und der TSH-Rezeptor (Thyroidea-stimulierendes Hormon) (3,4).

## 1.1 Hashimoto-Thyreoiditis

Die Hashimoto-Thyreoiditis, auch chronisch lymphozytäre Thyreoiditis genannt, wurde erstmalig 1912 von Dr. Hakaru Hashimoto beschrieben (5). Charakterisiert wird sie durch eine T-Zell-vermittelte Schilddrüsendestruktion mit Funktionsverlust sowie eine Autoantikörperbildung gegen Thyreoperoxidase und Thyreoglobulin (6). Die HT ist eine der häufigsten Autoimmunkrankheiten des Menschen und zugleich die häufigste Ursache für eine Hypothyreose. Sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen stellt sie die häufigste Schilddrüsenkrankung dar (7). In Deutschland tritt sie mit einer Prävalenz von 5-10% auf, wobei bevorzugt Frauen betroffen sind ( $w : m = 9 : 1$ ), der Altersgipfel liegt zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr (8 S. 738).

Ätiologisch handelt es sich bei der Hashimoto-Thyreoiditis um eine Interaktion zwischen multiplen Genen und triggernden Umweltfaktoren, die Krankheitsgenese ist somit multifaktoriell. Als genetische Prädisposition konnte eine Assoziation mit den *Human Leucocyte Antigen*-Merkmalen HLA-DR3, -DR4 und -DR5 identifiziert werden (2). Eine mögliche Erklärung für die Assoziation bestimmter HLA-Subgruppen mit Autoimmunerkrankungen könnte sein, dass die Selbst-Peptide verschiedene Bindungsaffinitäten für unterschiedliche HLA-Moleküle besitzen (6). Auch andere immunmodulatorische oder schilddrüsenspezifische Gene, wie CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*), PTPN22 (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*) und Thyreoglobulin-Gene spielen ätiologisch eine wichtige Rolle (9). Die Vererbung folgt allerdings nicht den Mendelschen Vererbungsregeln (10). Die Hashimoto-Thyreoiditis tritt auch häufig in Kombination mit anderen Autoimmunerkrankungen auf, wie Diabetes mellitus Typ 1, Morbus Addison, Vitiligo, Alopezie, Zölliakie und im Rahmen eines Polyglandulären Syndroms Typ 2 und 3 (7,11).

Beeinflussende Umweltfaktoren sind Infektionen, eine hohe Jodzufuhr (auch durch jodhaltige Medikamente wie Amiodaron) und Stress. Als infektiöse Trigger wurden Hepatitis C, Coxsackie Virus, Epstein-Barr-Virus und *Yersinia enterocolitica* beschrieben (2,12,13). In mehreren Studien wurde eine Assoziation mit einer akuten Parvovirus B19-Infektion herausgestellt, wobei das Virus sowohl in der Schilddrüse als auch im Blut nachweisbar war (5,13,14). Als möglichen Pathomechanismus des Parvovirus B19 postulierten Moffatt et al. die Induktion der Genexpression des proinflammatorischen Interleukin-6 (15). Der Zusammenhang eines Überkonsums von Jod und der Hashimoto-Entwicklung beim Menschen konnte durch epidemiologische Studien erwiesen werden (6). Diesbezüglich konnte eine große *Follow-up* Studie in China belegen, dass Menschen aus Regionen mit exzessiver Jodversorgung häufiger Autoantikörper gegen TPO und Tg entwickelten und dass dies ein Risikofaktor für die Entstehung einer Hypothyreose bei HT-Patienten war (16). Ein Tiermodell für Hashimoto-Thyreoiditis mit NOD.H2<sup>h4</sup>-Mäusen (*nonobese diabetic*) konnte bestätigen, dass die Prävalenz und das Krankheitsausmaß der Autoimmunthyreoiditis signifikant und dosisabhängig bei Mäusen anstiegen, die jodiertes Trinkwasser bekommen hatten (6).

Die Pathogenese der Hashimoto-Thyreoiditis beruht auf einer Infiltration der Schilddrüse durch CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, was zu einer inflammatorischen Destruktion der Thyreozyten führt. Im Verlauf kommt es infolgedessen zu einer Atrophie und Fibrose der Schilddrüse und im Spätstadium zu einer Hypothyreose (2).

Klinisch bleibt die Hashimoto-Thyreoiditis am Krankheitsbeginn meist unbemerkt, klassischer Weise kommt es anfangs zu einer diffusen schmerzlosen Vergrößerung der Schilddrüse (Struma). Die Diagnosestellung erfolgt teilweise erst im Stadium der Hypothyreose (2), jedoch bleiben die meisten Patienten euthyreot (7). Typische klinische Zeichen der manifesten Schilddrüsenunterfunktion (TSH erhöht, freies T4 erniedrigt) sind Antriebsarmut, Kälteintoleranz, depressive Verstimmung, Obstipation und trockene Haut (17). Laut McLachlan et al. kommt es außerdem bei 70% der hypothyreoten Hashimoto-Patienten (in den USA) zu einer Gewichtszunahme (18). Auch eine reduzierte Fertilität wurde bei Männern und Frauen mit Hypothyreose bei Autoimmunthyreoiditis festgestellt (19,20). Es konnte gezeigt werden, dass auch eine latente Hypothyreose, definiert als TSH-Elevation bei normalem freiem T4, zu relevanten Langzeitfolgen führen kann.

Beschrieben wurden ein erhöhtes Risiko für koronare Herzerkrankungen, ein erhöhtes LDL-Cholesterin, eine erniedrigte Knochendichte und ein negativer Einfluss auf die Hämostase (21,22). Andererseits kann es im Krankheitsverlauf der Hashimoto-Thyreoiditis auch zeitweise zu einer Hyperthyreose kommen, bedingt durch die Parenchymdestruktion und der damit verbundenen Freisetzung präformierter Schilddrüsenhormone (7). Der Schweregrad der HT variiert stark, während einige Patienten schon sehr früh eine Hypothyreose entwickeln, bleiben andere Patienten lebenslang euthyreot oder die Schilddrüsenfunktion erholt sich im Verlauf wieder (7,23).

Diagnostisch wegweisend ist ein Nachweis von Autoantikörpern gegen Thyreoglobulin und Thyreoperoxidase im peripheren venösen Blut des Patienten. Diese IgG-Autoantikörper stellen ein Hauptmerkmal der Hashimoto-Thyreoiditis dar, da 95% der HT-Patienten Anti-TPO positiv sind und 70% der Patienten Anti-Tg-Antikörper haben (8 S. 738 f.). Selten werden zusätzlich noch hemmende TSH-Rezeptor-Antikörper gebildet. Interessanterweise hat auch die Bildung von Autoantikörpern eine Geschlechterpräferenz. Li et al. beschrieben eine positive Korrelation der Autoantikörper mit weiblichem Geschlecht und höherem Alter (16). Ähnliche Ergebnisse bezüglich des Geschlechts hat auch die *Follow-up*-Studie des „*Whickham survey*“ gezeigt (24). Lange wurde kontrovers diskutiert, welche Rolle die Autoantikörper bei der Pathogenese der Hashimoto-Thyreoiditis spielen. Sind sie nur ein Epiphänomen oder kommt es durch eine Antikörper-vermittelte Zytotoxizität zur Schilddrüsenfollikeldestruktion? Nach aktuellem Wissensstand ist die Mehrheit der Autoren davon überzeugt, den Autoantikörpern keine Bedeutung bei der Krankheitsinitiation beizumessen (25,26). Die Hashimoto-Thyreoiditis wird wesentlich als T-Zell-vermittelte Erkrankung angesehen (18,27). Im Rahmen der diagnostischen Abklärung erfolgt auch eine Sonografie der Schilddrüse, diese stellt sich meist echoarm dar (11). Histologisch ist die HT charakterisiert durch einen progredienten Ersatz der Schilddrüsenfollikel und einer Infiltration mit B-Zellen, T-Zellen, follikulären und interdigitierenden Dendritischen Zellen (3).

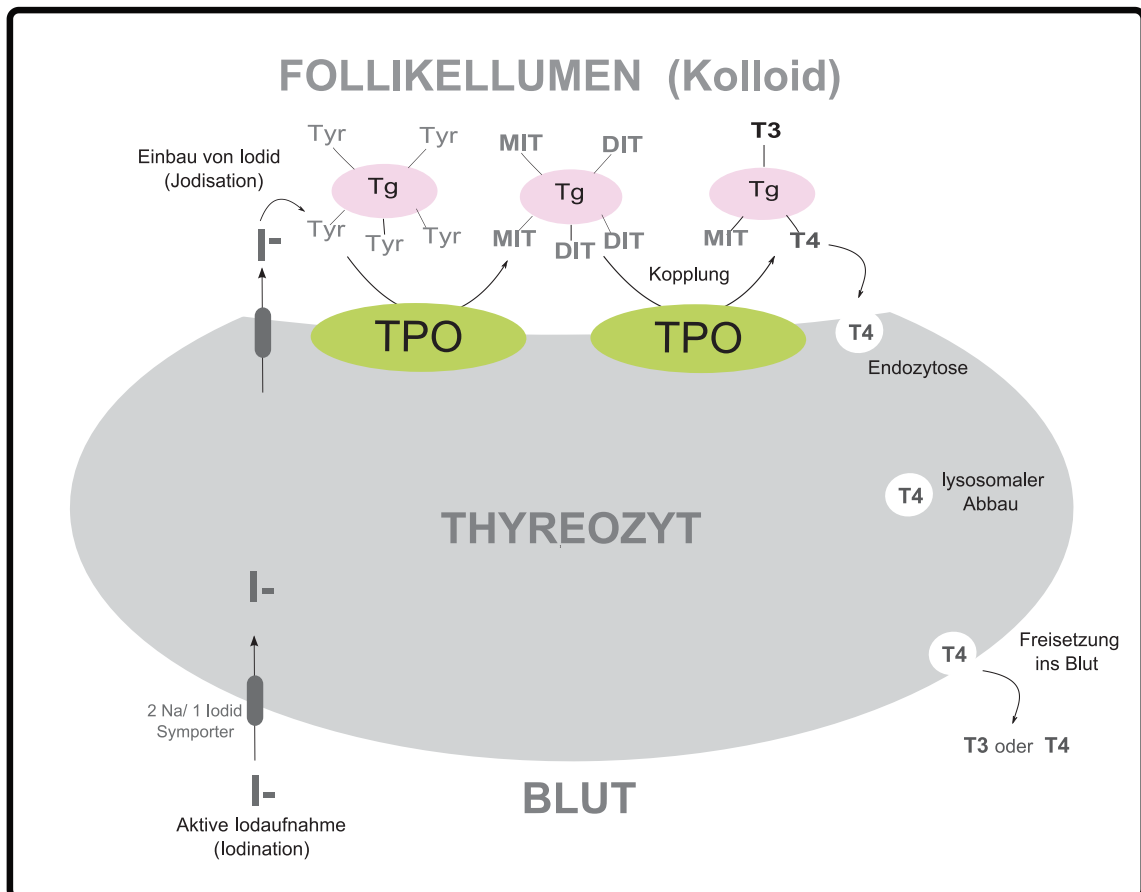
Therapeutisch ist im Falle einer Hypothyreose eine lebenslange L-Thyroxin-Substitution Mittel der ersten Wahl, wobei es unerlässlich ist, regelmäßig das TSH und das freie T4 des Patienten zu kontrollieren, um die Hormondosis gegebenenfalls anzupassen (7). Kurativ lässt sich der Krankheitsprogress nicht beeinflussen, mit einer optimalen Therapie ist die Lebenserwartung allerdings normal (28).

## 1.2 Die Antigene: Thyreoglobulin und Thyreoperoxidase

Tg und TPO sind schilddrüseneigene Strukturen mit wichtigen Funktionen für die Schilddrüsenhormonsynthese. Welches der beiden das Hauptziel im Autoimmunprozess der Hashimoto-Thyreoiditis ist, wird seit vielen Jahren kontrovers diskutiert.

Thyreoglobulin ist ein großes homodimeres Protein, es wird im rauen Endoplasmatischen Retikulum von Thyreozyten gebildet und ins Follikellumen sezerniert. Es ist der Vorläufer und zugleich Speicher der Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) (2,27) (Abb. 1). Die Freigabe der Hormone ins Blut erfolgt nach Proteolyse des Thyreoglobulins und obliegt einem *Feedbackmechanismus* zur Hypophyse, je nach Hormonbedarf. Die Schilddrüsenhormone haben einen positiven Einfluss auf Wachstum, Entwicklung und Hirnreifung, sie beeinflussen den Stoffwechsel, die Nervenleitgeschwindigkeit und die kardiale Katecholaminwirkung (29,30).

Thyreoperoxidase ist ein großes membrangebundenes Enzym (Glykoprotein) an der apikalen Oberfläche der Thyreozyten (dem Kolloid zugewandt) und besteht aus 933 Aminosäureresten (31,32). Das TPO-Gen ist auf Chromosom 2 lokalisiert, die TPO-Expression wird durch schilddrüsenpezifische Transkriptionsfaktoren wie TTF-1, TTF-2 und Pax8 kontrolliert (33). TPO hat eine Schlüsselfunktion bei der Schilddrüsenhormonsynthese mit drei Hauptaufgaben: die Oxidation von Jod, den Einbau von Jodid in Thyreoglobulin (Jodisation) und die oxidative Kopplung von Monojodtyrosin (MIT) und Dijodtyrosin (DIT) zu den Schilddrüsenhormonen T3 und T4. Aus zwei DIT-Molekülen wird T4, während ein MIT und ein DIT zu T3 verknüpft werden (2,33) (Abb. 1).



**Abb. 1: Die Rolle von TPO und Tg in der Schilddrüse**

Das zirkulierende Jodid wird aus dem Blut aktiv über den Natrium-Jodid-Symporter in der basalen Thyreozytenmembran aufgenommen (Jodination). Das apikale membrangebundene Glykoprotein Thyroperoxidase hat drei Hauptaufgaben: die Oxidation von Jod, den Einbau von Jodid in Thyroglobulin (Jodisation) und die Kopplung von MIT und DIT zu T3 oder 2 DIT zu T4. Thyroglobulin wird im rauen Endoplasmatischen Retikulum der Thyreozyten gebildet und ins Follikellumen sezerniert, es ist sowohl Speicher als auch Vorstufe der Schilddrüsenhormone. (Abkürzungen: MIT = Monojodtyrosin-Rest, DIT = Dijodtyrosin, Tyr = Tyrosinrest,  $I^-$  = Jodid, T3 = Trijodthyronin, T4 = Thyroxin). Inspiriert durch (34).

### 1.3 Die Kontrollgruppe: Strumapatienten

Eine Struma ist eine Schilddrüsenvergrößerung über 18 ml bei Frauen und über 25 ml bei Männern, unabhängig von der Stoffwechsellaage. Die meisten Strumapatienten sind euthyreot, das basale TSH ist also normwertig. Deutschland ist ein Jodmangelgebiet, sodass etwa 30% aller Erwachsenen von einer endemischen Struma betroffen sind. Rauchen und weibliches Geschlecht werden als weitere Risikofaktoren angesehen (22). Seltener Ätiologien sind sporadische oder genetisch bedingte Strumaerkrankungen (35).

Pathogenetisch kommt es durch den Jodmangel zu einer Produktion der Wachstumsfaktoren EGF (*epidermal growth factor*) und IGF I (*insulin-like growth factor I*) in der Schilddrüse, was in einer Thyreozytenhyperplasie resultiert. Weiterhin entsteht durch den Jodmangel auch ein Thyroxin- und Trijodthyroninmangel, was wiederum zur Schilddrüsenstimulation durch TSH aus dem Hypophysenvorderlappen führt und folglich zur Thyreozytenhypertrophie (8 S. 728). Aus einer einfachen Schilddrüsenvergrößerung kann im Verlauf eine Struma uni- oder multinodosa entstehen, woraus sich eine Schilddrüsenautonomie entwickeln kann. Dies kann potentiell zu einer Hyperthyreose führen. In selteneren Fällen kommt es zur Entstehung kalter Knoten, von denen 4% zu einem Schilddrüsenkarzinom entarten. Diagnostisch sind neben einer endokrinen Anamnese auch die Bestimmung des basalen TSH, fakultativ auch des freien T4 sowie eine Schilddrüsenultraschalluntersuchung indiziert (36).

Therapeutisch ist eine orale Jodid-Substitution das medikamentöse Mittel der ersten Wahl bei Strumapatienten ohne autonome Adenome. Auch eine Kombinationstherapie mit L-Thyroxin ist möglich, um die TSH-Sekretion als Wachstumsstimulus zu reduzieren. Im Verlauf sollte es dadurch zu einer Volumenreduktion der Schilddrüse kommen, regelmäßige Kontrolluntersuchungen sind notwendig (37,38). Bei großen Strumen, die bereits zu einer Verdrängung der Trachea und Schluckbeschwerden führen, ist eine operative Resektion indiziert. Bei inoperablen oder Rezidivstrumen ist eine Radiojodtherapie eine gute Option (36).

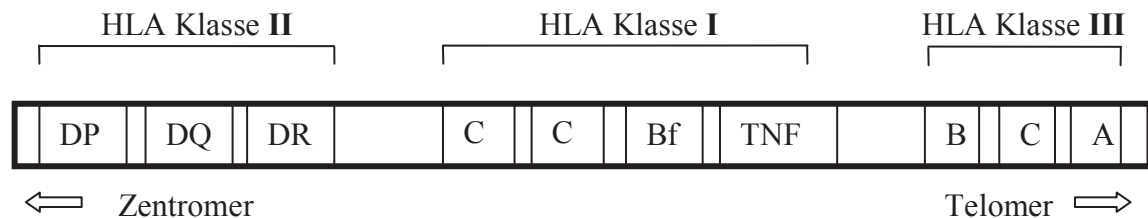
#### **1.4 Human leukocyte antigens**

Humane Leukozytenantigene (HLA) sind polymorphe membrangebundene Glykoproteine auf der Oberfläche von allen kernhaltigen Zellen. Sie dienen der interzellulären Erkennung und der Unterscheidung zwischen „selbst“ versus „fremd“ durch T-Zellen. Sie sind als Gengruppe im *major histocompatibility complex* (MHC) auf Chromosom 6 kodiert. Es gibt drei Genklassen (HLA I-III, Abb. 2) mit jeweils zwei HLA-Merkmalen pro Genort, ein maternales und ein paternales (Heterozygotie). HLA ist das humanspezifische MHC (39).

Humane Zellen exprimieren klassischer Weise sechs verschiedene MHC I-Moleküle mit insgesamt 266 Allelen und acht verschiedenen MHC II-Molekülen. Von jedem Molekül befinden sich bis zu 250 000 Kopien auf der Zelloberfläche (40). Moleküle der HLA-Klasse I (HLA-A/B/C) und II (DR, DQ, DP) dienen der Präsentation von



Peptidfragmenten zur Erkennung von körpereigenen Zellen und Pathogenen. Diese werden von T-Zellen erkannt, woraufhin eine Erregerabwehr erfolgen kann. HLA-Klasse III-Gene (C2, Bf, C4A, TNF, C4B) kodieren für Komplementfaktoren und Tumornekrosefaktoren (TNF) (40).



**Abb. 2: Lokalisation der drei HLA-Genklassen (I-III) auf Chromosom 6**

Pro Klasse sind 3-4 Merkmale (B, C, A etc.) exemplarisch dargestellt, stellvertretend für eine Vielzahl von Merkmalen und Allelen. (TNF = Tumornekrosefaktor). Inspiriert durch (8).

Die MHC I-Moleküle kommen auf fast allen kernhaltigen Zellen vor und bestehen aus einer polymorphen schweren Kette mit drei  $\alpha$ -Domänen und einem invarianten  $\beta_2$ -Mikroglobulin (Abb. 3). Das MHC I-Molekül kann Peptide mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren binden. Intrazelluläre Proteine aus dem Zytosol werden im Proteasom zu Peptiden fragmentiert und dann mittels Peptidtransporter TAP (*Transporter associated with antigen processing*) ins Endoplasmatische Retikulum transportiert, um dort an ein MHC I-Molekül gekoppelt zu werden. Der reife Komplex wird durch den Golgi-Apparat hindurch in Vesikeln an die Zelloberfläche verlagert (41). Der T-Zell-Rezeptor von zytotoxischen  $CD8^+$  T-Zellen bindet den MHC-Antigen-Komplex. Zur Aktivierung der T-Zelle bedarf es einer zusätzlichen Stimulation durch Korezeptoren wie dem  $CD8$ -Rezeptor. Auch körpereigene Zellproteine werden auf MHC I präsentiert, die T-Zelle bindet diese, wird dadurch aber nicht aktiviert (Selbsttoleranz) (41).

Das MHC II-Molekül kommt auf APCs (professionelle Antigen-präsentierende Zellen) vor, wie B-Lymphozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen. Es besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette mit jeweils zwei Domänen (Abb. 3) und bindet längere Peptide (12-24 Aminosäuren lang) (40). Die Hauptaufgabe besteht in der Präsentation von extrazellulären Proteinen, die per Endozytose in die APC aufgenommen und im Endosom zu Peptidfragmenten gespalten werden. Die Kopplung an das MHC II-Molekül erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum. Anschließend wird das Fragment der invarianten Kette CLIP (*class-II-associated invariant chain peptide*), welches eine



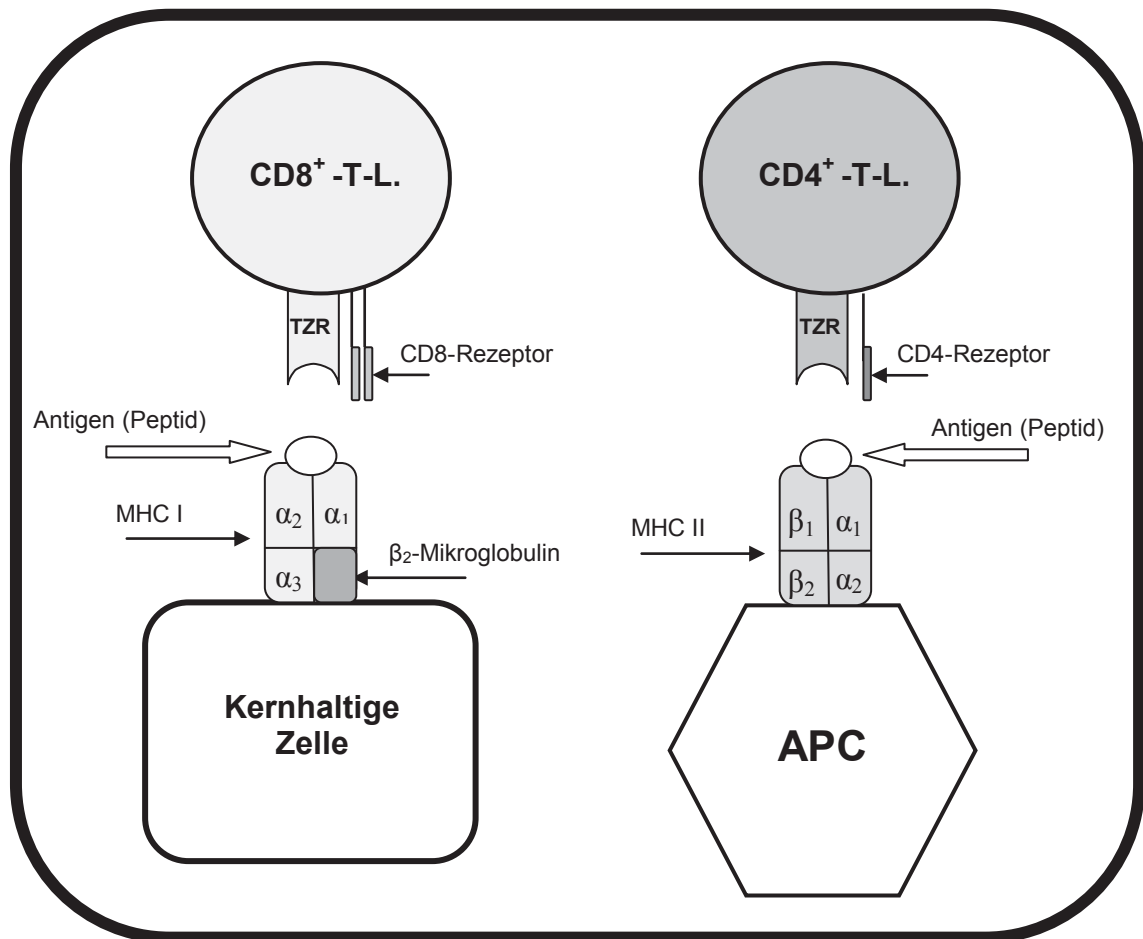
vorzeitige ungezielte Peptidbindung verhindern soll, im lysosomalen- und endosomalen Protein HLA-DM abgespalten (39,42).

Der Komplex wird an die Zelloberfläche transportiert und durch den T-Zell-Rezeptor und den CD4<sup>+</sup>-Korezeptor gebunden. Die T-Helferzelle wird somit aktiviert und kann mittels Zytokinsekretion B-Zellen zur Antikörperproduktion oder T-Zellen zur Zytolyse stimulieren, um die Erreger zu bekämpfen (39). Dass T-Zellen Antigene nur binden können, wenn sie zuvor aufbereitet und auf MHC-Molekülen präsentiert wurden, beschrieben Zinkernagel und Doherty bereits 1974 als MHC-Restriktion (43).

Zwei wichtige Eigenschaften des MHC machen das menschliche Immunsystem so effektiv in der Abwehr von unsagbar vielen Pathogenen: die Polygenie und der Polymorphismus. Der MHC ist polygen, denn er enthält multiple MHC I- und MHC II-Gene, sodass jeder Mensch eine individuelle Zusammensetzung von MHC-Molekülen besitzt (außer eineiige Zwillinge). Das führt zu einer unterschiedlichen Bandbreite der spezifischen Epitop-Bindungsmöglichkeiten und somit der Antigenspezifität der T-Zellen. Polymorph ist der MHC, weil es multiple Varianten eines jeden Gens innerhalb der Bevölkerung gibt (39). Innerhalb von Stämmen und Völkern haben sich unterschiedliche HLA-Subtypen schwerpunktmäßig durchgesetzt, unter anderem bedingt durch einen Selektionsdruck durch regionale Pathogene. Dies zeigt sich beispielsweise an der hohen Frequenz von HLA-B\*5301 in Westafrika, welches sich dort protektiv gegen Malaria bewährt hat. Dass diese Fähigkeit in Ostafrika bereits verloren gegangen ist, macht wiederum deutlich, dass Pathogene sich im Verlauf an die häufigsten HLA-Subtypen adaptieren können (40).

Die klinische Bedeutung von HLA-Merkmalen zeigt sich unter anderem anhand von Krankheiten, die mit bestimmten HLA-Subgruppen assoziiert sind, wie beispielsweise bei Patienten mit Morbus Bechterew, von denen die Majorität das HLA-B27-Merkmal tragen (44). Auch bei Transplantatabstoßung von Organen und Knochenmark zeigt sich die medizinische Relevanz der HLA-Merkmale. Spender und Empfänger werden möglichst gut HLA-*gematched* und der Empfänger wird immunsupprimiert, um die Gefahr einer Abstoßungsreaktion zu minimieren (45).

In der Datenbank <http://www.allelefreqencies.net> kann man unter anderem die regionale Verteilung von HLA-Subtypen in einer Bevölkerung nachschlagen (46). Laut Datenbank ist HLA-A2 in Deutschland eindeutig das häufigste HLA-Merkmal mit 49,9%.



**Abb. 3: Antigen-Präsentation mittels MHC-Molekülen**

CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen erkennen mittels T-Zell-Rezeptor (TZR) und kostimulierendem CD8-Rezeptor das Antigen auf dem MHC I-Molekül (bestehend aus einer  $\alpha$ -Kette mit drei Domänen und einem  $\beta_2$ -Mikroglobulin), präsentiert von kernhaltigen Zellen. Das MHC II-Molekül auf professionell Antigen-präsentierenden Zellen (APC) besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette mit je zwei Domänen und präsentiert das Antigen CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die es mithilfe ihres T-Zell-Rezeptors und des CD4-Korezeptors binden können.

(Abkürzungen: MHC = major histocompatibility complex, T-L. = T-Lymphozyten). Inspiriert durch (39).

## 1.5 Das Immunsystem und zytotoxische T-Zellen

Das Immunsystem ist ein komplexes Zusammenspiel von zellulären und humoralen sowie angeborenen und spezifischen Komponenten zur Abwehr von Infektionen und Tumorerkrankungen (41). Die angeborene Immunität dient der schnellen, aber unspezifischen Abwehr von Pathogenen.

Die erworbene Immunabwehr erfolgt etwas verzögert, ist aber spezifisch, dazu gehören z.B. die Antikörper-Produktion durch B-Zellen oder die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität. Beide Mechanismen greifen ineinander und beeinflussen sich gegenseitig.

Die Schlüsselrolle in der erworbenen zellulären Immunabwehr spielen T-Zellen. Sie entstehen im Knochenmark und migrieren zum Thymus um dort zu reifen (41). Dabei kommt es zu einer Reorganisation von Gensegmenten und der Entstehung eines spezifischen T-Zell-Rezeptors (TZR). Dieses transmembrane Antigen-Bindungsmolekül besteht aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Region und bindet antigene Epitope (47). Allerdings können T-Zellen Antigene nur binden, wenn sie durch Antigen-präsentierende Zellen zu kurzen Peptiden prozessiert und im MHC-Molekül präsentiert werden. Dies wird als MHC-Restriktion bezeichnet (48). Lange Zeit wurde angenommen, dass ein T-Zell-Rezeptor spezifisch für ein einziges Epitop ist. Diese Ansicht gilt mittlerweile als überholt. Vermutlich kann eine T-Zelle ungefähr  $1 \times 10^6$  strukturell-ähnliche MHC-assoziierte Epitope erkennen (49). Des Weiteren gibt es unterschiedliche modifizierte Peptid-Liganden, die zu verschiedenen Immunantworten führen: Agonisten im Sinne von stimulatorischen Liganden (führen zur Aktivierung, klonaler Expansion und Differenzierung der T-Zelle), Partial-Agonisten (induzieren Zytokinproduktion und Zytolyse aber keine T-Zell-Proliferation) und Antagonisten (können T-Zell-Aktivierung verhindern) (41,42,50).

Zur Aktivierung einer zytotoxischen T-Zelle bedarf es allerdings nicht nur einer spezifischen T-Zell-Rezeptor-Bindung des Antigens, sondern zusätzlich kostimulierenden Signalen, wie die Interaktion von CD28 (auf der T-Zelle) mit B7 (auf APC), sowie CD28 mit CD80/86 (auf Dendritischen Zellen). Folglich kommt es dann zur Proliferation und IL-2-Ausschüttung der T-Zelle. Durch Interaktion von B7 mit CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) kommt es hingegen zur Herunterregulation der T-Zelle (51). Des Weiteren hängt die T-Zell-Aktivierung von der Antigen-Dichte auf den APCs und der Stabilität der Bindung zwischen Antigen und MHC-Molekül ab (42).

Je nach Differenzierungsstatus der T-Zelle entwickelt sich diese von einer naiven T-Zelle zu einer Gedächtnis-T-Zelle (kann die Zielzelle nicht direkt töten, aber proliferiert und bildet Zytokine nach Antigenbindung) und letztlich zur Effektor-T-Zelle (Interferon- $\gamma$ -, Granzym- und Perforin positiv). Dabei nimmt die Zytotoxizität im Verlauf zu und die Oberflächenmarker verändern sich (41).

Die Einteilung reifer T-Lymphozyten erfolgt aufgrund ihrer Zelloberflächenmoleküle in T-Helferzellen ( $CD4^+$ ) oder zytotoxische T-Zellen ( $CD8^+$ ). Beide lassen sich abhängig von ihrem Zytokinsekretionsprofil in zwei Subtypen einteilen: T-Helferzellen Typ 1 (kurz Th1) und zytotoxische T-Zellen vom Typ 1 (kurz Tc1). Sie produzieren vor allem

INF- $\gamma$  und induzieren in ihren Zielzellen (beispielsweise virusbefallene Zellen) Apoptose mittels Perforin oder Fas-vermittelt. Th2- und Tc2- Zellen sezernieren maßgeblich IL-4 und IL-5 und agieren Perforin-vermittelt (52).

Die Aufgabe der CD8<sup>+</sup> T-Zellen besteht darin, virusinfizierte Körperzellen und Tumorzellen zu zerstören (41). Es gibt drei Hauptmechanismen der CD8<sup>+</sup> T-Zell-vermittelten Zytotoxizität. Erstens direkt durch Granzym B- und Perforin-Ausschüttung in den interzellulären Zwischenraum zur Zielzelle hin. Zweitens indirekt über die Sekretion von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und Interferon- $\gamma$ , was zur Apoptoseinduktion über den Kaspase-Signalweg führt. Drittens kann die Apoptoseinduktion mittels FasLigand auf der T-Zelle und Fas (= CD95) auf der Zielzelle, alias „Todesrezeptor-Stimulation“ erfolgen (41).

## 1.6 Autoimmunität versus Toleranz

Bei Autoimmunerkrankungen kommt es zu einer Abwehrreaktion von Immunzellen gegen körpereigene Antigene, die Selbsttoleranz bricht zusammen (2,23). Andererseits konnten Studien zeigen, dass auch im Blut gesunder Individuen autoreaktive T-Zellen vorkommen, ohne dem Menschen zu schaden. In der Regel handelt es sich dabei um gering affine T-Zell-Rezeptoren für Autoantigene (53).

Um die autoreaktiven Immunzellen unter Kontrolle zu halten, gibt es zentrale und periphere Toleranz-Mechanismen. Die zentrale Toleranz erfolgt im Thymus und umfasst die Deletion von autoreaktiven T-Zellen (54). Dabei kommt es zunächst zum Überleben und Klonen derjenigen Vorläufer-T-Zellen, dessen T-Zell-Rezeptor mit geringer Avidität an Selbstpeptid-MHC-Komplexe auf Thymusepithelzellen binden können (Positivselektion) (42). Im Gegensatz dazu gehen Vorläufer-T-Zellen, die einen T-Zell-Rezeptor exprimieren, der hoch affin für Selbstpeptide ist, in Apoptose (Negativselektion) (42).

Ein Teil der autoreaktiven T-Zellen entgeht der Deletion im Thymus und gelangt in die Peripherie (55). Periphere Toleranz beschreibt die Kontrolle von autoreaktiven T-Zellen in der Peripherie. Dort gibt es T-Zell-intrinsische und extrinsische Mechanismen, um den Ausbruch einer Autoimmunität zu verhindern. Zu den intrinsischen Mechanismen zählen Ignoranz, Anergie, nicht-pathogene Zytokinsekretion und aktivierungsinduzierte Apoptose der autoreaktiven T-Zelle. Wenn die selbstreaktive T-Zelle das Autoantigen nicht bindet, weil es nicht oder nicht in ausreichenden Mengen verfügbar ist, wird dies

als Ignoranz bezeichnet (54). Zur funktionellen Inaktivierung (Anergie) kommt es durch eine partiale oder insuffiziente Stimulation der T-Zelle nach Autoantigen-Bindung. Hierbei wird eine Beteiligung von T-Zell-Molekülen wie CTLA-4 (56–58) und PD-1 (*programmed cell death 1*) vermutet (54). Die „nicht-pathogene Zytokinsekretion“ beschreibt eine vollständig durch Antigen-Bindung aktivierte autoreaktive T-Zelle, die ihr Zytokinsekretionsprofil ändert, in Richtung eines nicht-pathogenen Typ 2-Profiles, sodass es folglich nicht zum Zellschaden kommt. In Tiermodellen konnte eine reduzierte Autoimmunität durch Typ 2-Zytokine (IL4, IL5, IL10) bei experimenteller Autoimmun-Encephalomyelitis (EAE) und Diabetes mellitus nachgewiesen werden (59,60). Beim aktivierungsinduzierten Zelltod der autoreaktiven T-Zelle kommt es nach Antigen-Bindung und T-Zell-Aktivierung zur Apoptose durch Hochregulation des FasLiganden (61,62).

Zu den extrinsischen peripheren Toleranzmechanismen gehören Dendritische Zellen und Regulatorische T-Zellen. Wenn Dendritische Zellen ein Fremdantigen während einer Infektion binden, werden sie aktiviert und regulieren auf ihrer Oberfläche MHC II sowie kostimulierende Moleküle (z.B. ICAM-1 = *Intercellular Adhesion Molecule 1*) hoch. Sie produzieren Zytokine wie IL-12, um vor allem CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren. Einen anderen Mechanismus beschrieben Kurts et al. 1996 als sogenannte Kreuzpräsentation. Dabei sind Dendritische Zellen auch in der Lage, Pathogene (also exogene Antigene) nach Aufnahme und Prozessierung über MHC I-Moleküle CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen zu präsentieren und diese zu aktivieren. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde angenommen, dass zytotoxische T-Zellen nur durch die Antigen-MHC-I-Bindung der infizierten Zelle aktiviert werden können und eine Zytolyse durchführen (61,63). Selbst-Antigene werden von Dendritischen Zellen (DC) kontinuierlich gesammelt und den T-Zellen präsentiert und zwar erstens, klassisch mittels MHC II, wobei die DC dadurch nicht aktiviert wird und die T-Zelle nicht stimuliert. Normale T-Zellen werden durch Autoantigene nicht aktiviert, sie reagieren mit Toleranz. Zweitens können Selbst-Antigene auch mittels Kreuzpräsentation von Dendritischen Zellen mittels MHC I präsentiert werden.

Treffen diese dann auf autoreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen, kommt es laut Kurts et al. zu einer aktivierungsinduzierten T-Zell-Apoptose (wesentlich mittels Fas/FasLigand) und somit zu einer Abwehr von Autoimmunität, was als Kreuztoleranz bezeichnet wurde (61,63,64). Dendritische Zellen stellen somit einen wichtigen Regulationsmechanismus zwischen Selbstantigen und (autoreaktiver) T-Zelle dar. Eine weitere Zellpopulation

trägt wesentlich zur Verhinderung von Autoimmunität bei: Regulatorische T-Zellen (kurz  $T_{\text{regs}}$ ). Diese  $CD4^+ CD25^+$  Zellen (auch charakterisiert durch den Transkriptionsfaktor Foxp3 (65)) sind involviert in die Prävention von Autoimmunkrankheiten, Allergien, Organabstoßungsreaktionen und *Graft-versus-Host-Disease* (66) durch Suppression von Immunzellen, wie T-Zellen, Natürliche Killerzellen, B-Zellen und Dendritische Zellen (67). Sie entstehen auf zwei verschiedenen Wegen. Die natürlich vorkommenden  $T_{\text{regs}}$  entstehen bereits im Thymus als eine T-Zell-Subgruppe mit einer breiten T-Zell-Rezeptorvariabilität zur Erkennung von Selbst- und Fremdantigenen (68). Andererseits gibt es induzierte  $T_{\text{regs}}$ , die in der Peripherie aus  $CD4^+$  T-Zellen durch bestimmte Stimulationsbedingungen entstehen (68). Zur  $T_{\text{reg}}$ -Bildung im Thymus und zum Überleben und der Aktivierung in der Peripherie bedarf es wesentlich einer Stimulation durch Interleukin-2 (69), wobei eine Interaktion des Korezeptors CD28 mit B7 auch eine Rolle bei der Entstehung im Thymus spielt (70). Es gibt multiple Interventionsmechanismen der Regulatorischen T-Zellen, um Effektorzellen direkt oder indirekt über Dendritische Zellen zu modulieren, teilweise durch Sekretion immunsupprimierender Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$ 1 oder mittels Zell-Zell-Kontakt mit der Effektorzelle (67,68). Dabei inhibieren die  $T_{\text{regs}}$  die Proliferation der Effektorzelle und deren IL-2-Produktion (71). Die Bedeutung von CTLA-4 wird in diesem Zusammenhang kontrovers diskutiert. Während Wing et al. in einem CTLA-4-defizienten Mausmodell das Entstehen von Autoimmunerkrankungen beschreiben (72), konnten Tran et al. trotz CTLA-4-Blockierung mittels Antikörper keine Einschränkung in der  $T_{\text{reg}}$ -Reaktion feststellen (73). Die protektive Rolle von regulatorischen T-Zellen gegen Autoimmunität ist mittlerweile unbestritten, wie anhand zahlreicher Tiermodelle bewiesen wurde (68). Beispielsweise konnte durch Studien mit Nacktmäusen ohne Thymus gezeigt werden, dass das Fehlen von Regulatorischen T-Zellen zu multiplen Autoimmunerkrankungen der Mäuse führte (54).

Zur Entstehung von Autoimmunität gibt es drei wesentliche Theorien: *Epitope Spreading*, Molekulares Mimikry und *Bystander*-Aktivierung.

### **1.6.1 Epitope Spreading**

Ein Epitop ist eine antigene Determinante oder eine Seite einer Antigen-Oberfläche, woran ein Antikörper oder ein T-Zell-Rezeptor binden können (74). Epitope, die aufgrund ihrer Lokalisation unzugänglich für das Immunsystem sind, werden als

kryptisch definiert. Immunzellen konnten diesen versteckten Epitopen gegenüber keine Selbsttoleranz entwickeln. Sofern das Autoantigen nicht im Thymus verfügbar ist, kann es folglich nicht zur Negativselektion der autoreaktiven T-Zellen kommen (42). Wenn diese Epitope dann durch einen Gewebeschaden oder eine Inflammation in den Umlauf des Organismus gelangen (bezeichnet als *Epitope spreading*), kommt es zu einer Abwehrreaktion der als fremd wahrgenommenen Epitope (75,76). An einem Mausmodell für Multiple Sklerose wurde das *Epitope Spreading* untersucht. Theiler's muriner Encephalomyelitis-Virus induzierte dabei die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen gegen endogene Myelin-Epitope (77).

### **1.6.2 Molekulares Mimikry**

Kommt es im Rahmen einer viralen oder bakteriellen Infektion zur Aktivierung von T-Zellen und/oder B-Zellen durch pathogene Epitope, kann es durch eine strukturelle Ähnlichkeit mit körpereigenen Epitopen (Molekulares Mimikry) zu einer Kreuzreaktion kommen. Die Immunzellen richten sich im Anschluss an die Infektabwehr gegen die Autoantigene (78,79). Quaratino et al. fanden bezüglich der besagten strukturellen Ähnlichkeit der Epitope heraus, dass T-Zellen nicht direkt die Primärsequenzen der Peptide erkennen, sondern deren antigene molekulare Oberfläche (48). Verschiedene Tiermodelle konnten die These der Autoimmunität durch ein Molekulares Mimikry veranschaulichen, wie beispielsweise die Induktion einer murinen experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (analog zur humanen Multiplen Sklerose) durch virale Peptide. Diese ähnelten dem MBP (*Myelin Basic Protein*), dem Zielmolekül der T-Zell-vermittelten Autoimmunität (79). Das rheumatische Fieber, das nach einer Infektion mit Streptokokken der Gruppe A entsteht, gilt als Beispiel eines Molekularen Mimikry mit anschließender Autoantikörper-vermittelter Autoimmunerkrankung (80).

### **1.6.3 Bystander-Aktivierung („Zuschaueraktivierung“)**

Virusinfektionen führen zu einer Abwehrreaktion verschiedener Immunzellen und zu einer Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (54). Die Zuschaueraktivierung beschreibt eine indirekte oder unspezifische Aktivierung von Immunzellen, während sie sich in einem inflammatorischen Milieu von anderen aktivierten Immunzellen befinden (81). Es kommt zu einer Zuschaueraktivierung einer autoreaktiven T-Zelle, wenn sie in

der Nähe einer aktivierten Dendritischen Zelle ist, die immunstimulierende Zytokine sezerniert (80).

Erforscht wurde die *Bystander*-Aktivierung beispielsweise an NOD-Mäusen (*nonobese diabetic*) mit Typ 1 Diabetes mellitus. Durch eine Virusinfektion wurden dabei im Pankreas Antigen-präsentierende Zellen aktiviert, die wiederum lokale autoreaktive T-Zellen indirekt aktivierten. Diese griffen die Inselzellen an, was letztlich zur Diabetes-Entwicklung führte (80).



## 2 ZIEL DER ARBEIT

Das Ziel meiner Doktorarbeit war die Quantifizierung und Charakterisierung der Thyreoperoxidase- und Thyreoglobulin-epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut und in Schilddrüsenpunktaten von Hashimoto-Thyreoiditis-Patienten. Die Ergebnisse wurden mit denen von Kontrollgruppen (Strumapatienten, Gesunde) verglichen. Zusammenhänge zwischen der Anzahl der epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der Höhe der Serumautoantikörper Anti-TPO und Anti-Tg wurden analysiert. Die Anzahl der autoreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde in Relation zur HT-Krankheitsdauer betrachtet. Unterschiede in der Lyseinduktion durch sechs verschiedene TPO- und Tg-Epitope wurden ermittelt.

### 2.1 Problemstellung: das Hauptziel der Autoimmunität

Nach aktuellem Wissenstand konnte bislang nicht ausreichend geklärt werden, welches der beiden Antigene, Thyreoperoxidase oder Thyreoglobulin, entscheidender an der Initiation und am Progress der Hashimoto-Thyreoiditis beteiligt ist, beziehungsweise ob eines der beiden das Hauptziel für die Autoimmunität darstellt. Die Wissenschaft bietet diesbezüglich zahlreiche kontroverse Studien. Obwohl die Infiltration und Zerstörung der Schilddrüse durch epitopspezifische zytotoxische T-Zellen im Vordergrund dieser Erkrankung stehen, sind diese autoreaktiven Zellen nicht wesentlich in die Diagnostik eingegangen. Diagnostischer Goldstandard ist der Nachweis der Serumautoantikörper Anti-TPO und Anti-Tg.

### 2.2 Fragestellungen

Aus der Problemstellung ergaben sich mehrere interessante Fragestellungen, die es zu untersuchen galt:

- Sind autoreaktive TPO- und Tg-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Hashimoto-Patienten im peripheren Blut nachweisbar – und wenn, gibt es eine Dominanz eines der beiden Epitope, sodass daraus ein autoimmunes Hauptziel erkennbar ist? Ist das Ergebnis in der Schilddrüse dieser Patienten ähnlich?
- Wie verhält sich die Anzahl dieser zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu den Serumautoantikörpern Anti-TPO und Anti-Tg? Gibt es eine Korrelation?

- Sinkt oder steigt die Anzahl der autoreaktiven epitopspezifischen T-Zellen im Krankheitsverlauf der Hashimoto-Thyreoiditis über Jahre? Lässt sich hier eine Dominanz von Thyreoperoxidase oder Thyreoglobulin ausmachen?
- Führen verschiedene TPO- und Tg-Epitope zu unterschiedlichen Lyseraten durch epitopspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Hashimoto-Patienten bei funktionellen Zytotoxizitätstests *in vitro*?

### 2.3 Methodischer Ansatz

Um die CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu quantifizieren, wurden diese aus dem peripheren Blut sowie aus Schilddrüsenaspirationspunktaten isoliert, mit je drei TPO- und Tg-Tetrameren gefärbt und mittels Durchflusszytometrie gemessen. 37 HLA-A2<sup>+</sup> Hashimoto-Patienten mit 5 Feinnadelpunktaten zählten zur Experimentalgruppe, während die Kontrollgruppe aus 16 HLA-A2<sup>+</sup> Strumapatienten (mit 7 Schilddrüsen-Punktaten), 3 HLA-A2<sup>-</sup> Hashimoto-Patienten sowie 10 gesunden Personen bestand. Die Ergebnisse der Tetrameranalysen wurden mittels Prism Graph Pad statistisch ausgewertet und hinsichtlich eines Zusammenhangs zu der Höhe der Autoantikörper Anti-TPO und Anti-Tg untersucht. Weiterhin wurde analysiert, wie sich die Anzahl der epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Krankheitsverlauf der Hashimoto-Thyreoiditis über Jahre verhält. Um die funktionelle Lysekapazität von epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen von HLA-A2<sup>+</sup> HT-Patienten bezüglich der sechs verschiedenen Epitope *in vitro* zu testen, wurden Zytotoxizitätstests mithilfe von Annexin/Propidiumiodid-Färbungen durchgeführt. Monozyten (Zielzellen) und die CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Effektorzellen) wurden hierfür kokultiviert und mit den TPO- und Tg-Epitopen gepulst.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Brutschrank	Heraeus HERA cell	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Durchflusszytometrie- Gerät	FACS Calibur TM	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Fotomikroskop	Nikon Digital Camera DXm 1200	Nikon, Tokyo, Japan
Lichtmikroskop	Leica DMIL	Leica, Wetzlar, Deutschland
Magnetische Zellseparation	Magnetbank	Miltenyi, Bergisch- Gladbach, Deutschland
Pipetten	STRIPETTE R 5 ml, 10 ml, 25 ml	costar <sup>®</sup> , Corning, New York, USA
Pipettierhilfen	pipetus <sup>®</sup>	HIRSCHMANN Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
	Mehrkanalpipette (12 Kanäle): Finnpipette Digital Multichannel 50-300 µl	FINNPIPETTE, Labsystems, Helsinki, Finnland
Vortexer	Vortex-2-Genie	Scientific Industries (SI), New York, USA
	Heidolph REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Werkbank	Heraeus HERA safe	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Zellzählkammern	NEUBAUER IMPROVED- Zählkammer, 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm <sup>2</sup>	Laboroptik, Friedrichsdorf, Deutschland

	Plastik-Einmal-Zählkammer: KOVA <sup>®</sup> , GLASSTIC <sup>®</sup> SLIDE 10 with grids, 100 slides, Combination Coverslip- Microscope Slides	HYCOR Biomedical, CA, USA
Zentrifugen	Universal 30 RF	Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
	ROTIXA 120R	

### 3.1.2 Einmalmaterialien

Pipettenspitzen	Pipettenspitzen TipOne <sup>®</sup> : 0,1-10 µl Extended Length Filter Tips 1-200 µl Graduated Filter Tips 1-100 µl Bevelled Filter Tips 101-1000 µl Extended Length Filter Tips	StarLab, Ahrensburg, Deutschland
	Pipettenspitzen: research: 50 µl, 100 µl, 1000 µl variabel: 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100- 1000 µl	
Magnetische Zellisolation	MiniMACS <sup>™</sup> Separator: für 1 Säule OctoMACS <sup>™</sup> Separator: für 8 Säulen	Miltenyi, Bergisch- Gladbach, Deutschland
	MACS <sup>®</sup> Separation Columns (Größe MS oder LS)	
Probengefäße	CPT-Röhrchen (Vacutainer Cell Preparation Tubes)	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
	Cryo.s TM, Einfrierröhrchen, 1 ml	greiner bio-one
	Falcon-Röhrchen: Polypropylene Conical Tube Falcon BLUE MAX TM, 50 ml und 15 ml	CELLSTAR <sup>®</sup> , Frickenhausen, Deutschland
	FACS Tube	Sarstedt <sup>®</sup> , Sarstedt,

	Falcon TM 5ml Polystyrene Round-Bottom	Deutschland
Kulturplatten	6-well-Platten: TC-Plate, 6 well, steril	greiner bio-one CELLSTAR <sup>®</sup> , Frickenhausen, Deutschland
	24-well-Platten: Multiwell TM 24 well Tissue Culture Plate, flat bottom with low evaporation lid, sterile	FALCON <sup>®</sup> , Lincoln Park, New Jersey, USA
	96-well-Platten: TC-Plate, 96 well <ul style="list-style-type: none"> <li>• U-shape (= round bottom)</li> <li>• V-shape</li> <li>• flat-bottom</li> </ul>	greiner bio-one CELLSTAR <sup>®</sup> , Frickenhausen, Deutschland

### 3.1.3 Lösungen, Zusätze und Puffer

Aquadest: Spüllösung/Irrigation Solution 1000 ml	Deltaselect GmbH, Pfullingen, Deutschland
Erylysepuffer: Buffer EL Erythrocyte lysis buffer 1000 ml	Qiagen, Hilden, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, München, Deutschland
FC-Receptor blocking reagent	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
FCS (fetales Kälberserum)	GIBCO <sup>®</sup> , New York, USA
L-Glutamin	
MACS Puffer	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Penicillin, Streptomycin	GIBCO <sup>®</sup> , New York, USA
RPMI 1640, 1x 2187, + L-Glutamine, 500 ml	
Ovalbumin	Glycotope Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Trypanblau-Lösung 0,4%	Sigma, München, Deutschland
Vitaminlösung	GIBCO <sup>®</sup> , New York, USA

### 3.1.4 Zytokine

GM-CSF (= Granulocyte macrophage colony-stimulating factor)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Interferon alfa	
rhIL-2 (recombinant human Interleukin 2 ) E. coli-derived, 50 µg, > 97% Purity	
rhIL-7 (recombinant human Interleukin 7) E. coli-derived, 25 µg, > 97% Purity	
rhIL-15 (recombinant human Interleukin 15) E. coli-derived, 25 µg, > 97% Purity	

### 3.1.5 Einfrier- und Kulturmedien

Einfriermedium	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20% DMSO (Dimethylsulfoxid)</li> <li>• 80% FCS</li> </ul>
Monozyten-Kulturmedium	<ul style="list-style-type: none"> <li>• in TT-Kulturmedium: <math>1 \times 10^6</math> Zellen/4 ml</li> <li>• 1% Penicillin/Streptomycin</li> <li>• 10% FCS</li> <li>• 1000 U/ml GM-CSF</li> <li>• 10.000 U/ml IFN-<math>\alpha</math></li> <li>• 50 ng/ml Peptide</li> </ul>
TT- Medium	<ul style="list-style-type: none"> <li>• In RPMI 1640, 1x, 2187, L-Glutamine, steril, (500 ml)</li> <li>• 1% Penicillin/Streptomycin (5 ml)</li> <li>• 10% FCS (50 ml)</li> <li>• 1% Vitaminlösung (5 ml)</li> <li>• 1% L-Glutamin (5 ml)</li> </ul>
T-Zell-Kulturmedium	<ul style="list-style-type: none"> <li>• in TT-Kulturmedium : <math>1 \times 10^6</math> Zellen/ml</li> <li>• 50 U/ml IL-2</li> <li>• 20 U/ml IL-7</li> <li>• 10 ng/ml IL-15</li> <li>• 50 ng/ml Peptide</li> </ul>

### 3.1.6 Fluoreszenzantikörper und Nekrosefärbungen

FITC-konjugierte Antikörper		
Antikörper	Isotyp (alle murin)	Hersteller
CD3	IgG1	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
CD8	IgG2a	
CD45	IgG2b	
CD69	IgG1	
IgG1	IgG1	
IgG2b	IgG2b	

PE-konjugierte Antikörper		
Antikörper	Isotyp (alle murin)	Hersteller
CD4	IgG1	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
CD8	IgG1	
CD14	IgG1	
CD25	IgG1	
CD45	IgG2b	
HLA-A2	IgG1	
IgG1	IgG1	
IgG2a	IgG2a	
IgG2b	IgG2b	

APC-konjugierte Antikörper		
Antikörper	Isotyp (alle murin)	Hersteller
CD8	IgG1	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
CD25	IgG1	
CD45	IgG1	
IgG1	IgG1	



PerCP-konjugierte Antikörper		
Antikörper	Isotyp (alle murin)	Hersteller
CD8	IgG1	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
CD45	IgG1	
IgG1	IgG1	
IgG2b	IgG2b	

Apoptose/Nekrose-Färbungen	
Anti-Annexin V-APC AK	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Camptothecin (Topoisomerase-I-Inhibitor)	Sigma, München, Deutschland
Propidiumiodid (PI)	

### 3.1.7 Peptide und Tetramere (HLA-A2-restringiert)

Alle kalkuliert durch die Datenbank SYFPEITHI ([www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)).

humane Thyreoperoxidase				
	Aminosäuren- Position		Bindungs- affinität	Glycotope Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
TPO 1	857-865	L L I G G F A G L	31	
TPO 2	3-11	A L A V L S V T L	29	
TPO 3	118-126	A L S E D L L S I	29	

humanes Thyreoglobulin				
	Aminosäuren- Position		Bindungs- affinität	Glycotope Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Tg 1	2355-2363	G L L D Q V A A L	31	
Tg 2	2750-2758	G L R E D L L S L	30	
Tg 3	841-850	S L Q D V P L A A L	30	

### 3.1.8 Isolations-Kits

Annexin V MicroBead Kit	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
CD14 MicroBeads human	
CD8 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit human	
Dead-Cell Removal Kit	
Monocyte Isolation Kit II human	
Pan T Cell Isolation Kit II human	

### 3.2 Patienten und Kontrollen

Die Akquirierung der Patienten erfolgte im Rahmen von Routine- und Verlaufsuntersuchungen in der Ambulanz der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Es wurden keine zusätzlichen invasiven Maßnahmen durchgeführt. Genehmigt wurde die Studie durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Aktenzeichen Nr. 3354). Jeder Patient bekam eine schriftliche Information zur Studie, sowie eine zusätzliche Aufklärung durch einen Facharzt in der endokrinologischen Ambulanz. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von jedem Patienten eingeholt. Alle Experimente wurden gemäß der Prinzipien der Helsinki Deklaration durchgeführt.

Insgesamt haben 66 Personen die Studienbedingungen erfüllt (Diagnose eindeutig bekannt, Serumantikörper der HT-Patienten vorhanden) und wurden in die Studie eingeschlossen. Die Probanden setzten sich zusammen aus 49 Frauen und 17 Männer im Alter zwischen 19 und 77 Jahren (Mittelwert 45,2 Jahre; Median 44 Jahre), wobei davon insgesamt 63 Personen HLA-A2<sup>+</sup> waren und 3 Personen HLA-A2<sup>-</sup>. Zur Experimentalgruppe zählten 37 HLA-A2<sup>+</sup> HT-Patienten im Alter zwischen 19-67 Jahren (Mittelwert 44,1 Jahre; Median 45 Jahre, 33 Frauen und 4 Männer). Zu den Kontrollgruppen gehörten 3 HLA-A2<sup>-</sup> HT-Patienten im Alter von 34-38 Jahren (Mittelwert 36,7 Jahre; Median 38 Jahre, 2 Frauen und 1 Mann), 16 HLA-A2<sup>+</sup> Strumapatienten (Mittelwert 57,2 Jahre, Median 61 Jahre, Altersbereich 29-77 Jahre, 11 Frauen und 5 Männer), sowie 10 HLA-A2<sup>+</sup> gesunde Probanden zwischen 23 bis 52 Jahren (Mittelwert 32,7 Jahre; Median 26,5 Jahre, 3 Frauen und 7 Männer).

Hashimoto-Thyreoiditis wurde definiert durch das Vorkommen von Thyreoperoxidase-Autoantikörpern (> 35 U/ml) und/oder Thyroglobulin-Autoantikörpern (> 40 U/ml)

sowie optional eine Hypoechogenität der Schilddrüse bei der Sonografie. Für die Korrelationsanalysen zwischen der Anzahl der epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der korrespondierenden Serumantikörper der HT-Patienten, beziehungsweise dem Zeitpunkt der Krankheitsmanifestation, wurden nur Patienten ohne Schilddrüsen-Hormonsubstitution mit L-Thyroxin eingeschlossen.

### **3.3 Spezimen: Vollblut und Schilddrüsenpunktat**

#### **3.3.1 Blutentnahme**

Jeweils ein Röhrchen peripheres venöses Blut (ca. 8 ml) wurde von den Patienten in heparinisierten CPT-Röhrchen (*Vacutainer Cell Preparation Tubes* von BD Bioscience) in der endokrinologischen Ambulanz entnommen.

#### **3.3.2 Schilddrüsenpunktion**

Im Rahmen von Schilddrüsen-Routinepunktionen in Form einer Aspirationszytologie von Patienten mit Knotennachweis in der Schilddrüse (Hashimoto- und Struma nodosa-Patienten) wurde für diese Studie nur das Restgewebe in der Nadel, durch mehrmaliges Spülen mit isotoner Kochsalzlösung, verwendet, während der Hauptanteil des Gewebes in der Zytopathologie untersucht wurde. Es wurden also keine zusätzlichen invasiven Maßnahmen für die Studie durchgeführt. Deshalb konnten nur 12 geeignete Schilddrüsenpunktate (5 von HLA-A2<sup>+</sup> HT-Patienten und 7 von HLA-A2<sup>+</sup> Strumapatienten von den insgesamt 66 oben beschriebenen Studienteilnehmern) akquiriert werden. Die Feinnadelaspirationsbiopsie der Schilddrüse erfolgte ultraschallgesteuert mittels 23G Nadel von erfahrenen Fachärzten der Klinik für Endokrinologie der Universitätsklinik Düsseldorf. Das Schilddrüsenaspirat der HT-Patienten wurde mit dem von nicht-autoimmunerkrankten Struma nodosa-Patienten verglichen.

### 3.4 Methoden

#### 3.4.1 Waschen und Zentrifugieren von Zellen

Falls nicht anders angegeben, wurden die Zellen mit MACS-Puffer oder PBS gewaschen und bei 1400 rpm (ohne Bremse) bei 4°C 5 Minuten zentrifugiert (Universal 30 RF oder ROTIXA 120R). Bei längeren Wartezeiten wurden die Zellen dunkel auf Eis gelagert.

#### 3.4.2 Kryokonservierung von Zellen

Falls die Zellen nicht am selben Tag analysiert werden konnten, wurden sie in 1 ml-Kryoröhrchen überführt und in einer Isopropanol-Einfrierbox bei -80°C eingefroren. Das dafür verwendete Einfriermedium, hergestellt aus 20% DMSO (Dimethylsulfoxid) und 80% fetalem Kälberserum, wurde 1 : 1 mit der Zellsuspension vermischt.

#### 3.4.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzählung erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer oder einer Plastik-Einmal-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop von Leica. Die Färbung der Zellen mit 0,4% Trypanblau diente dabei der Unterscheidung zwischen vitalen und avitalen Zellen, da nur avitale Zellen durch den Verlust ihrer Membranintegrität eine blaue Farbe annehmen. Die absolute Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{vitale Zellen}}{\text{gezählte Großquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Gesamtvolumen (ml)} \times 10^4$$

mind. 2 (wegen Trypanblau)

#### 3.4.4 HLA-Typisierung der Spezimen

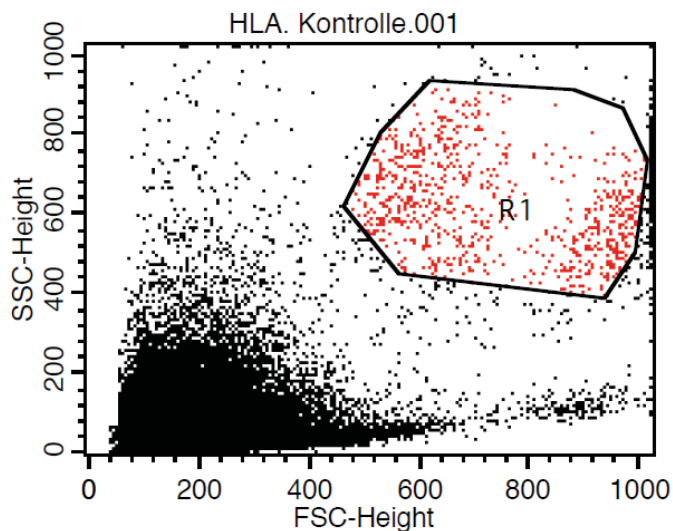
Da die TPO- und Tg-Tetramere für HLA-A2<sup>+</sup> Zellen konstruiert wurden, mussten die Spezimen zunächst hinsichtlich ihrer HLA-A2-Positivität überprüft werden. Zur HLA-Typisierung wurde in 3 FACS-Tubes je 30 µl heparinisiertes Vollblut mit 50 µl FCS vermischt und gevortext. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur folgte die Fluoreszenz-Antikörperfärbung der Proben, wobei alle Antikörper (AK) von Becton Dickinson bezogen wurden. Die Patientenprobe wurde mit je 10 µl Anti-CD45 FITC und Anti-HLA-A2 PE-AK für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die ersten beiden Proben dienten nur der optimalen Gateeinstellung des

Durchflusszytometriegerätes. Dabei wurde die erste Probe mit Anti-CD45 FITC und die Zweite mit Anti-CD45 PE gefärbt. Die Erythrozyten wurden mithilfe von 2 ml Erythrozyten-Lysepuffer durch eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur entfernt. Anschließend wurde je 1 ml MACS-Puffer hinzugefügt und die Proben bei 1400 rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Die Pellets wurden in 300 µl Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und direkt analysiert mittels Durchflusszytometrie. Abbildung 4 zeigt eine exemplarische HLA-Typisierung.

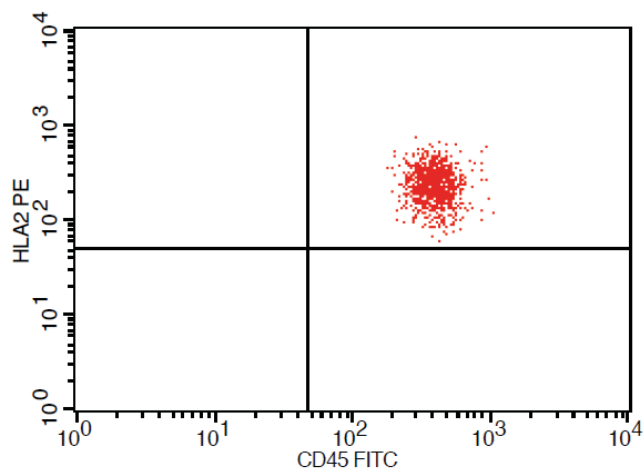
### 3.4.5 Durchflusszytometrie und Auswertung

Alle Messungen wurden am Durchflusszytometriegerät FACS (= *fluorescence activated cell sorting*) Calibur TM von BD Bioscience durchgeführt. Bei dieser Methode werden Zellen in hoher Geschwindigkeit an einem (Argon-)laser vorbeigeführt und hinsichtlich ihrer Zelleigenschaften analysiert. Dabei werden sie im Vorwärtsstreulicht (FSC = *forward scatter*) bezüglich ihrer Größe und im Seitwärtsstreulicht (SSC = *side scatter*) hinsichtlich ihrer Granularität untersucht. Um die Anzahl bestimmter Zellen zu messen, werden zelltypische Oberflächenmoleküle oder Rezeptoren mit Fluoreszenz-Antikörpern markiert. Die gängigsten Fluoreszenzfarbstoffe sind FITC, PE, APC und PerCP. Wird kurz vor der Messung 10 µl Propidiumiodid (PI) in die Probe pipettiert, kann man nekrotische Zellen im FACS erkenntlich machen. PI ist ein DNA-Farbstoff, der nekrotische Zellen aufgrund ihrer Membrandurchlässigkeit färbt. Vor der eigentlichen Messung der Patientenproben, wurden Kontrollmessungen zur Einstellung der *Gates* für die Quadrantenanalyse am Durchflusszytometriegerät durchgeführt. Ein Zellzahlzielwert pro Probe muss eingestellt werden. Wie der obere Teil von Abb. 4 zeigt, wurden zunächst die vitalen Zellen ausgewählt.

Nach jeder abgeschlossenen Messung wurden die Daten mit der BD-CellQuest-Pro Software ausgewertet und die Zellpopulationen grafisch als Punktwolke dargestellt (Abb. 4, unterer Teil).



Probe: CD45 FITC + HLA-A2 PE



**Abb. 4: Repräsentative HLA-Typisierung aus Vollblut**

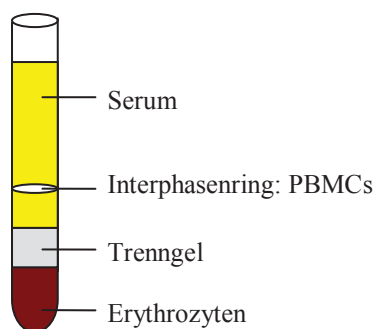
Die Vollblutprobe des Patienten wurde mit Fluoreszenzantikörpern (Anti-CD45 FITC und Anti-HLA-A2 PE), gefärbt und mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Zellen wurden zuvor als vitale Zellen = R1 *gated*. CD45 ist auf allen menschlichen Leukozyten zu finden. Die Punktwolke der Probe zeigt somit HLA-A2<sup>+</sup> Leukozyten eines Patienten.

**3.4.6 Isolierung der peripheren mononukleären Zellen**

Nach der HLA-Typisierung erfolgte die Isolierung der peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) aus dem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation. Zu den PBMCs gehören T- und B-Zellen, Dendritische Zellen, Natürliche Killerzellen und Monozyten. Zur Isolierung wurde das Vollblut der Patienten zunächst in einem CPT-Röhrchen (*Vacutainer Cell Preparation Tube*) bei 1750 rcf und 21°C 20 Minuten zentrifugiert. Durch diesen Arbeitsschritt wurden die Zellen vom Serum getrennt, wobei die Erythrozyten aufgrund ihrer Dichte ganz unten im Röhrchen zu liegen kommen und

sich in der Mitte des Röhrchens ein weißer Interphasenring bildet, der die PBMCs enthält (Abb. 5). Für diese Dichtegradientenzentrifugation bedarf es einer Zentrifuge mit ausschwingenden Röhrchenhaltern und einer ausstellbaren Bremse, damit sich die Phasen nicht wieder vermischen. Ein Großteil des Serums wurde verworfen. Der weiße Interphasenring wurde mit dem Restserum abpipettiert und in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt. Um die maximale Zellzahl zu gewinnen, wurde das CPT-Röhrchen nochmals mit MACS-Puffer nachgespült und die Suspension entnommen. Es folgten ein Waschgang mit MACS-Puffer und die anschließende Zentrifugation.

Falls das Zellpellet noch zu viele Erythrozyten enthielt, wurde es mit 10 ml Erylysepuffer resuspendiert und zur Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur dunkel abgedeckt. Anschließend wurde das Röhrchen mit MACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschgang mit MACS-Puffer und Zentrifugation konnte das Pellet resuspendiert werden und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt werden.



**Abb. 5: CPT-Röhrchen mit zentrifugiertem Vollblut**

Die Erythrozyten befinden sich unterhalb des Trenngels. Der weiße Interphasenring innerhalb des Serums enthält die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs). CPT = *Vacutainer Cell Preparation Tube*.

**3.4.7 Isolierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus PBMCs**

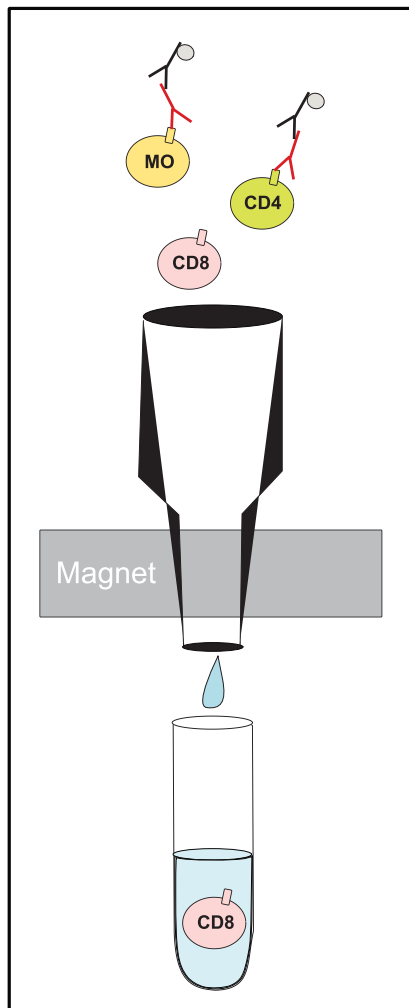
Um die CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den PBMCs zu isolieren, wurde die Methode der magnetischen Zellseparation (*magnetic activated cell sorting*, MACS) angewandt. Das Verfahren basiert auf der Antikörperbindung an spezifische Zelloberflächenmoleküle, wobei die Antikörper mit Magnetpartikeln (sogenannte *MicroBeads*) gekoppelt sind. Man unterscheidet eine positive von einer negativen Selektion. Werden die gewünschten Zellen magnetisch beladen, bleiben diese im Magnetröhrchen hängen und

alle anderen Zellen laufen hindurch. Dies wird als positive Selektion bezeichnet. Werden alle anderen Zellen außer den gewünschten markiert, ist das eine negative Selektion.

Die Isolation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den PBMCs der Patienten erfolgte als negative Selektion mittels humanem *CD8<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit* von Miltenyi. Alle nicht-CD8<sup>+</sup> Zellen, wie z.B. CD4<sup>+</sup> T-Zellen,  $\gamma/\delta$  T-Zellen, B-Zellen, Natürliche Killerzellen, Dendritische Zellen, Monozyten, Granulozyten und Erythrozyten, wurden dabei mit einem *Bead*-gekoppelten Antikörper markiert und aussortiert. Nach der Zellzahlbestimmung der PBMCs mittels Neubauer-Zählkammer wurden diese in 40  $\mu$ l MACS-Puffer resuspendiert und mit 10  $\mu$ l *CD8<sup>+</sup> T Cell Biotin-Antibody Cocktail* (enthält Antikörper gegen CD4, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123, TCR  $\gamma/\delta$  und CD235a) vermischt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden 30  $\mu$ l MACS-Puffer und 20  $\mu$ l *CD8<sup>+</sup> T Cell MicroBead Cocktail* (enthält Antikörper gegen CD14 und gegen Biotin) hinzugefügt. Nach weiteren 15 Minuten auf Eis und einem Waschgang mit 2 ml MACS-Puffer, wurde das Pellet in 500  $\mu$ l MACS-Puffer aufgenommen.

Die ausgewählte magnetische Filtersäule in der Größe MS (*MACS*® *Separation Columns* von Miltenyi, geeignet für  $2 \times 10^8$  Zellen) wurde in der Magnetbank platziert, mit 500  $\mu$ l MACS-Puffer äquilibriert und die Zellsuspension dann hineingefüllt. Nach dreimaligem Nachspülen mit je 500  $\mu$ l MACS-Puffer konnte die Durchlaufflüssigkeit, die ausschließlich ungelabelte CD8<sup>+</sup> T-Zellen enthielt, zentrifugiert werden (Abb. 6). Da die Schilddrüsenpunktate viel weniger Zellen als das Vollblut enthielten, wurde auf die CD8<sup>+</sup> T-Zellisolation verzichtet, um keinen weiteren Zellverlust zu verursachen.





**Abb. 6: CD8<sup>+</sup> T-Zell-Isolierung mittels Magnetbank**

Oben sieht man Zellen (CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T-Zelle, Monozyt = MO), die an ihrer Oberfläche einen Primärantikörper und daran einen Sekundärantikörper mit Magnetpartikeln gebunden haben. Während sie durch die Säule fließen, bleiben die Magnetpartikel im Magnetfeld hängen, sodass nur die ungelabelten Zellen durchlaufen und in das unten stehende Falcon-Röhrchen gelangen.

### 3.4.8 Tetramerfärbung

Um die TPO- und Tg-epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels Durchflusszytometrie zu quantifizieren, wurden Tetramere benötigt. Ein Tetramer ist ein Molekülkomplex aus vier MHC I-Komplexen, die an ein Fluorochrom-konjugiertes Streptavidin gekoppelt sind (Abb.7) (82). Die Tetramere gewährleisten eine stabilere Bindung des T-Zell-Rezeptors an die Epitope und ermöglichen deren Messung mittels Durchflusszytometrie. Die hier verwendeten TPO- und Tg-Peptid epitope sowie TPO- und Tg-Tetramere wurden entsprechend ihrer Bindungsaffinitäten ausgewählt, kalkuliert durch die MHC-Datenbank SYFPEITHI ([www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)).

Bindungsaffinitäten von  $\geq 15$  werden als hoch immunogen angesehen, alle sechs ausgewählten TPO- und Tg-Tetramere hatten Bindungsaffinitäten zwischen 29 und 31. Entsprechend der Kalkulation durch SYFPEITHI, wurden alle sechs TPO- und Tg-Peptidepitope bzw. die Tetramere, laborchemisch von der Firma Glycotope Biotechnology in Heidelberg hergestellt.

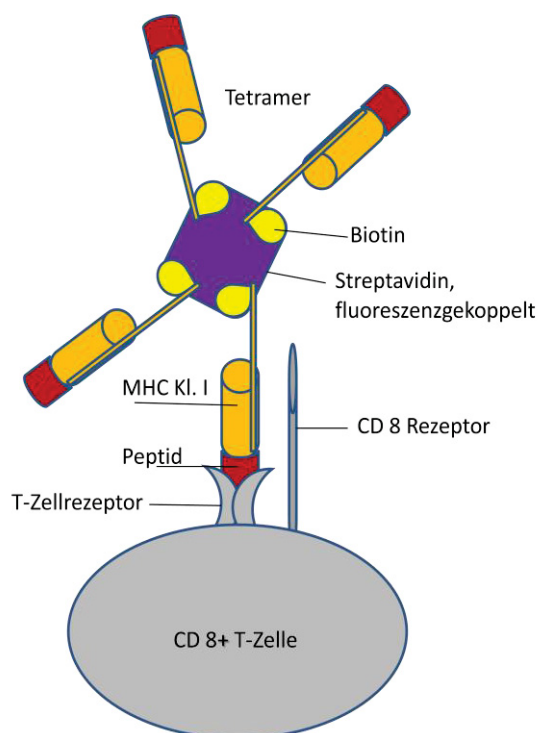
Die folgenden PE-konjugierten Tetramere und korrespondierenden Epitope wurden ausgewählt: TPO 1 (Aminosäurenposition (AS) 857-865): LLIGGFAGL, TPO 2 (AS 3-11): ALAVLSVTL, TPO 3 (AS 118-126): ALSEDLLSI, Tg 1 (AA2355-2363): GLLDQVAAL, Tg 2 (AA2750-2758): GLREDLLSL, und Tg 3 (AA841-850): SLQDVPLAAL. Die Restriktion der verwendeten Tetramere und Peptide auf das HLA-Merkmal „A2“ beruht darauf, dass ein Großteil der deutschen Bevölkerung dieses Merkmal trägt (in Deutschland 49%, siehe Einleitung) und es zu kostenintensiv wäre, alle sechs TPO- und Tg-Tetramere für alle HLA-Isotypen herzustellen. Der HLA-A2-Isotyp ist somit am weitesten verbreitet und am besten kommerziell erhältlich.

Vor Beginn der Tetramerfärbung wurden acht FACS-Röhrchen gemäß Tabelle 1 beschriftet. Die isolierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen bzw. das Schilddrüsenpunktatmaterial wurde mit MACS-Puffer resuspendiert und je 200  $\mu$ l davon in jedes FACS-Röhrchen pipettiert. 800  $\mu$ l FCS (fetales Kälberserum) und 200  $\mu$ l FCR *blocking reagent* wurden ergänzt, um die unspezifischen Bindungsstellen der Zellen zu blockieren. Von der jeweiligen TPO- bzw. Tg-Tetramersuspension wurden jeweils 4  $\mu$ l hinzugegeben (Tabelle 1). Anschließend erfolgte eine abgedunkelte Inkubation der Röhrchen auf Eis für eine Stunde. Nach einem Waschgang mit kaltem MACS-Puffer wurden die Proben bei 1400 rpm und 4°C 5 Minuten zentrifugiert und in MACS-Puffer resuspendiert. Je 100  $\mu$ l wurden davon in jedes FACS-Röhrchen pipettiert. Dann erfolgte die Antikörperfärbung mit je 10  $\mu$ l Anti-CD8 FITC für jede Probe. Alle AK wurden von BD Bioscience bezogen. Es wurden außerdem mindestens drei Kontrollen zur optimalen *Gate*-Einstellung am FACS erstellt (Tabelle 1). Nach 15-minütiger Inkubationszeit auf Eis unter dunkler Abdeckung folgte ein Waschgang, sowie das Resuspendieren mit MACS-Puffer. Vor der Messung der Proben am FACS-Gerät, wurde in jede Probe 10  $\mu$ l Propidiumiodid hinzugefügt, um nekrotische Zellen herausrechnen zu können.

<b>Färbung der Proben:</b>	<b>Kontrollen zur Gateeinstellung am FACS:</b>
Jeweils 4 µl Tetramer + 10 µl Anti-CD8 FITC + 10 µl PI	Jeweils 10 µl AK
P1: TPO 1	K1: Anti-CD45 FITC
P2: TPO 2	K2: Anti-IgG1 PE
P3: TPO 3	K3: Anti-CD8 FITC + Anti-CD45 PE
P4: TPO 1-3	
P5: Tg 1	
P6: Tg 2	
P7: Tg 3	
P8: Tg 1-3	

**Tabelle 1: Schema zur TPO- und Tg-Tetramerfärbung**

Acht Proben (P) mit je 4 µl Tetramer pro FACS-Röhrchen und drei Kontrollen (K) zur Gateeinstellung für die Quadrantenanalyse am Durchflusszytometriegerät.



**Abb. 7: Ein Tetramer gebunden an eine CD8<sup>+</sup> T-Zelle**

Die CD8<sup>+</sup> T-Zelle hat einen CD8-Rezeptor und einen T-Zell-Rezeptor mit gebundenem Tetramer. Im Zentrum des Tetramers befindet sich ein fluoreszenzgekoppeltes Streptavidin, an das vier MHC Klasse I-Komplexe gebunden sind. Inspiriert durch (83).

### 3.4.9 Messung von TSH, Anti-TPO und Anti-Tg

Die Bestimmung der TPO- und Tg-Serumantikörper erfolgte im Rahmen der Routine-Schilddrüsendiagnostik im Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Universitätsklinik Düsseldorf (Institutsleiter Prof. Dr. med. Boege). Die TPO- und Tg-AK wurden mithilfe von „IMMULITE 2000 systems“ bestimmt, die TSH-Serumlevel mithilfe von „Cobas e Immunoassay-systems“ gemessen.

### 3.4.10 Zytotoxizitätstest

Um die Zytotoxizität der epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Hashimoto-Patienten zu ermitteln, wurden Lyseexperimente mithilfe von Annexin- und Propidiumiodid-Färbungen durchgeführt. Als Zielzellen dienten Patienten-Monozyten, die in der Zellkultur ausgereift wurden. Für die 3-tägigen Analysen wurde ein Röhrchen Vollblut pro Patient benötigt.

Am ersten Tag wurden die PBMCs durch Dichtegradientenzentrifugation (siehe 3.4.6) aus Vollblut isoliert. Es folgte die Separation von Monozyten aus den PBMCs mittels humanem *CD14 MicroBead-Kit* von Miltenyi. Hierfür wurden die PBMCs in 80 µl MACS-Puffer aufgenommen und mit 20 µl *CD 14 MicroBead Cocktail* (ausreichend für 10<sup>7</sup> Zellen) vermischt. Diese *Beads* markieren die Monozyten im Sinne einer positiven Selektion. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit 2 ml MACS-Puffer zentrifugiert (1400 rpm, 4°C, 5 Minuten) und in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die magnetische Filtersäule der Größe MS wurde in die Magnetbank eingesetzt und die Zellsuspension in die Filtersäule pipettiert. Die Säule wurde noch dreimal mit MACS-Puffer nachgespült. In der Durchlaufflüssigkeit befanden sich dementsprechend alle Nicht-Monozyten. Diese wurden in einem Falconröhrchen aufgefangen und zur weiteren Nutzung zentrifugiert. Um die Monozyten aus der Säule zu gewinnen, wurde das Röhrchen aus dem Magnetfeld entfernt und mit MACS-Puffer über einem Falconröhrchen durchgespült. Die Monozyten wurden nach Zentrifugation in TT-Medium aufgenommen (2,5 x 10<sup>5</sup> Zellen /ml) und in 6-well Platten ausgesät. TT-Medium enthält RPMI 1640 mit GlutaMAX, 10% fetales Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin und 1% Vitaminlösung. Um die Reifung der Monozyten in Richtung Dendritischer Zellen zu fördern wurde das TT-Medium durch 1000 U/ml GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) und 10000 U/ml Interferon-α ergänzt. 50 µg/ml des jeweiligen TPO- und Tg-Peptids wurden

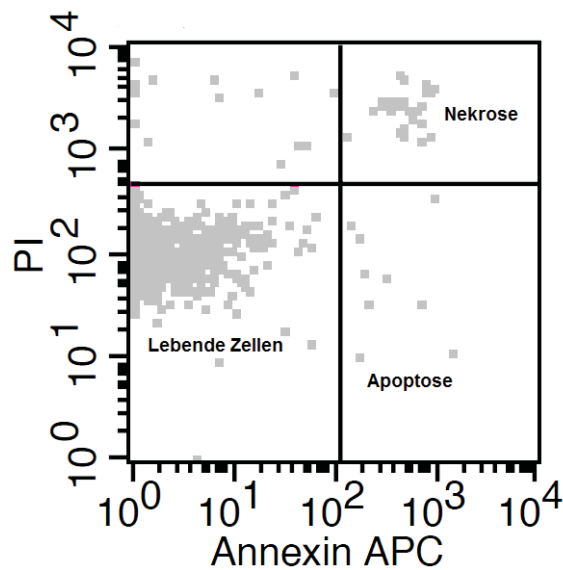
hinzugefügt. In den Proben mit multiplen Peptiden (TPO 1-3, Tg 1-3 und TPO/Tg 1-6) wurde die hinzugefügte Menge der Einzelpeptide auf 1/3 beziehungsweise 1/6 reduziert um insgesamt eine Peptidkonzentration von 50 µg/ml zu erreichen. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Die PBMCs aus der Durchlaufflüssigkeit wurden nach Zentrifugation in TT-Medium ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) aufgenommen, welches durch T-Zell-reifungsfördernde Interleukine ergänzt wurde (50 U/ml IL-2, 20 U/ml IL-7, 10 ng/ml IL-15). Nachdem die Zellsuspension in 24-well Platten ausgesät war, wurden die jeweiligen TPO- und Tg-Peptide hinzugefügt. Auch diese Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Am zweiten Tag wurden die PBMCs aus den 24-well Platten geerntet, gewaschen und zentrifugiert. Es folgte eine Isolierung der  $CD8^+$  Zellen aus den PBMCs mittels humanem *CD8<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit* (gemäß 3.4.7). Auch die gereiften Monozyten wurden aus den 6-well Platten geerntet, gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurden die isolierten  $CD8^+$  Zellen zusammen mit den gereiften Monozyten in einem 5:1-Verhältnis (T-Zellen : Monozyten) in T-Zell-Interleukinmedium aufgenommen und in 96-well Platten ausgesät. Die jeweiligen TPO- und Tg-Peptide wurden nochmals in einer Konzentration von 50 µg/ml hinzugefügt. Als Negativkontrolle wurden T-Zellen und Monozyten mit Ovalbumin, aber ohne Peptide inkubiert. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen mit 6 µl Camptothecin, einem Topoisomerase-I-Inhibitor und Nekrose-auslösendem Zellgift ausgesät. Die Kokulturen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Am dritten Tag wurden alle wells separat geerntet und die Zellsuspensionen in FACS-Röhrchen überführt. Jede Probe wurde dann mit 10 µl Anti-Annexin V-APC Antikörpern gefärbt und nach 15-minütiger abgedunkelter Inkubation auf Eis mit MACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und resuspendiert. Unmittelbar vor der Analyse mittels Durchflusszytometrie (FACS Calibur von BD Bioscience) wurde jede Probe noch durch 10 µl Propidiumiodid (PI) ergänzt. Das Prinzip der Annexin V/PI-Färbung beruht darauf, dass apoptotische Zellen Phosphatidylserin von innen nach außen auf die Zelloberfläche kehren, welches durch Annexin V gebunden wird (84). Spät-apoptotische und nekrotische Zellen haben eine durchlässige Membran und lassen sich deshalb zusätzlich mit dem DNA-Farbstoff PI anfärben, sowie mit Annexin-V, sie sind somit doppelt gefärbt (Abb. 8). Diese doppeltgefärbten Zellen, als Zeichen für eine zytotoxisch-vermittelte Zellnekrose durch Perforin und Granzym-B, wurden innerhalb

der unterschiedlichen Peptidgruppen und den Kontrollen verglichen. Lebende Zellen sind hingegen Annexin-V- und PI-negativ.

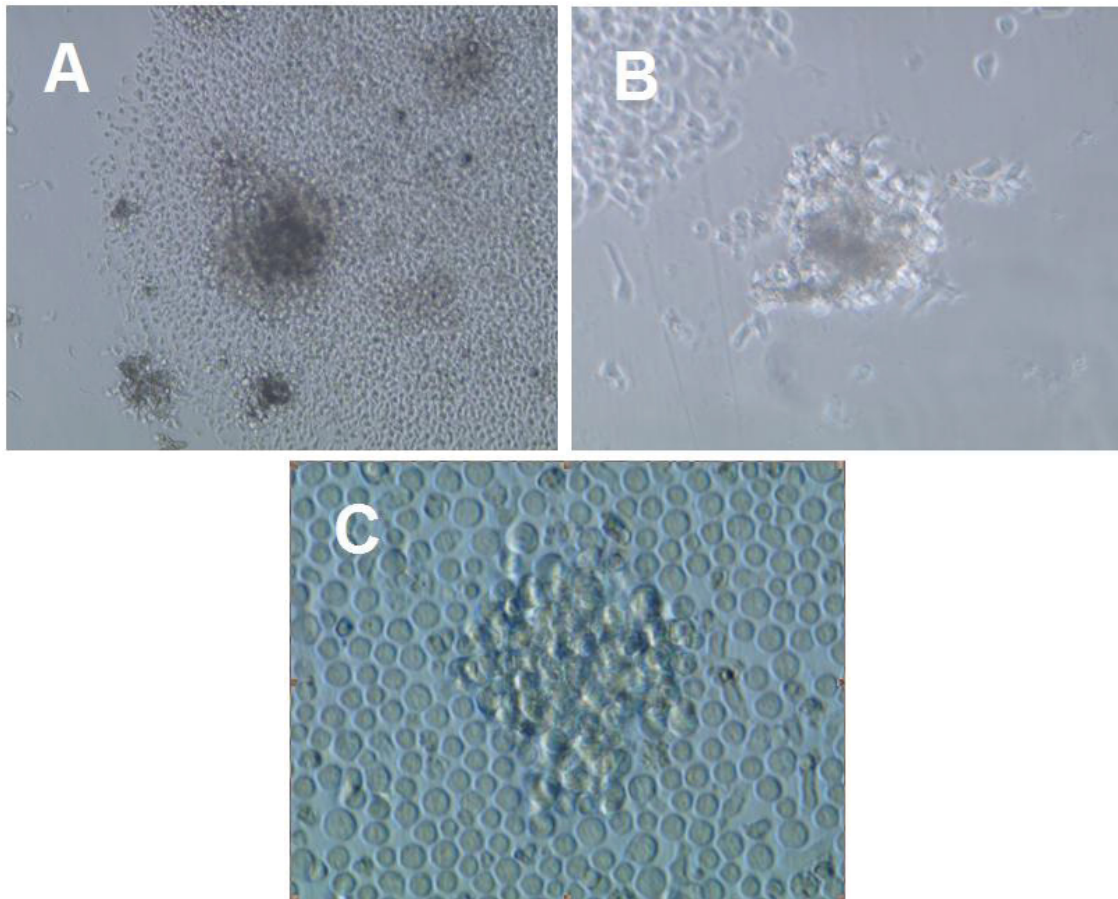


**Abb. 8: FACS-Analyse nach Zellfärbung mit Annexin V und Propidiumiodid (PI)**

Apoptotische Zellen (unten rechts) kehren Phosphatidylserin von innen nach außen auf die Zelloberfläche, welches durch Annexin V gebunden wird. Spät-apoptotische und nekrotische Zellen haben eine durchlässige Membran und lassen sich deshalb mit dem DNA-Farbstoff PI anfärben, sowie mit Annexin-V, sie sind doppelt gefärbt (oben rechts). Lebendige Zellen (unten links) sind Annexin-V- und PI-negativ.

### 3.4.11 Zellkultur für die Zytotoxizitätstests

Im Rahmen der Zytotoxizitätstests wurden die isolierten T-Zellen und gereiften Monozyten der HT-Patienten kultiviert. Die Zellkultur wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt, bei allen Verbrauchsmaterialien handelte es sich um sterile Einmalartikel. Die Zellen wurden in *multiwell*-Platten in einem Brutschrank bei 37°C, mit 5% Kohlenstoffdioxid und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% inkubiert. Wachstum und Morphologie wurden unter einem Lichtmikroskop begutachtet (Abb. 9).



**Abb. 9: Lichtmikroskopie von Monozyten in Zellkultur**

Zellhaufen von Monozyten in 6-well Platten unter dem Fotomikroskop (Nikon Digital Camera DXm 1200) nach Zellkultur über Nacht mit GM-CSF und INF- $\alpha$  in TT-Medium.

A) in 10-facher Vergrößerung, B) in 20-facher Vergrößerung, C) in 40-facher Vergrößerung.

### 3.5 Statistische Analyse

Alle Daten wurden nach Projektabschluss mit dem Programm Prism und der GraphPad Software analysiert und grafisch dargestellt. Ergebnisse mit  $p < 0,05$  wurden als signifikant gewertet, wobei Signifikanztests bei gerichteten Hypothesen einseitig und bei ungerichteten Hypothesen zweiseitig durchgeführt wurden.

Normalverteilte Daten wurden mit dem unpaarigen Student-t-Test berechnet, für nicht-normalverteilte Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test genutzt. Die Berechnung der Zusammenhänge zwischen intervallskalierten Daten erfolgte mittels Korrelationskoeffizienten nach Pearson. Die Voraussetzungen für alle verwendeten parametrischen Tests, wie zum Beispiel eine Normalverteilung oder die Varianzhomogenität der Daten, wurde entsprechend überprüft (z.B. Kolmogorov-Smirnov-Test, Levene-Test). Häufigkeitsverteilungen wurden mithilfe des  $\chi^2$ -Test analysiert.



## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Quantifizierung der TPO- und Tg-spezifischen CD8<sup>+</sup> T

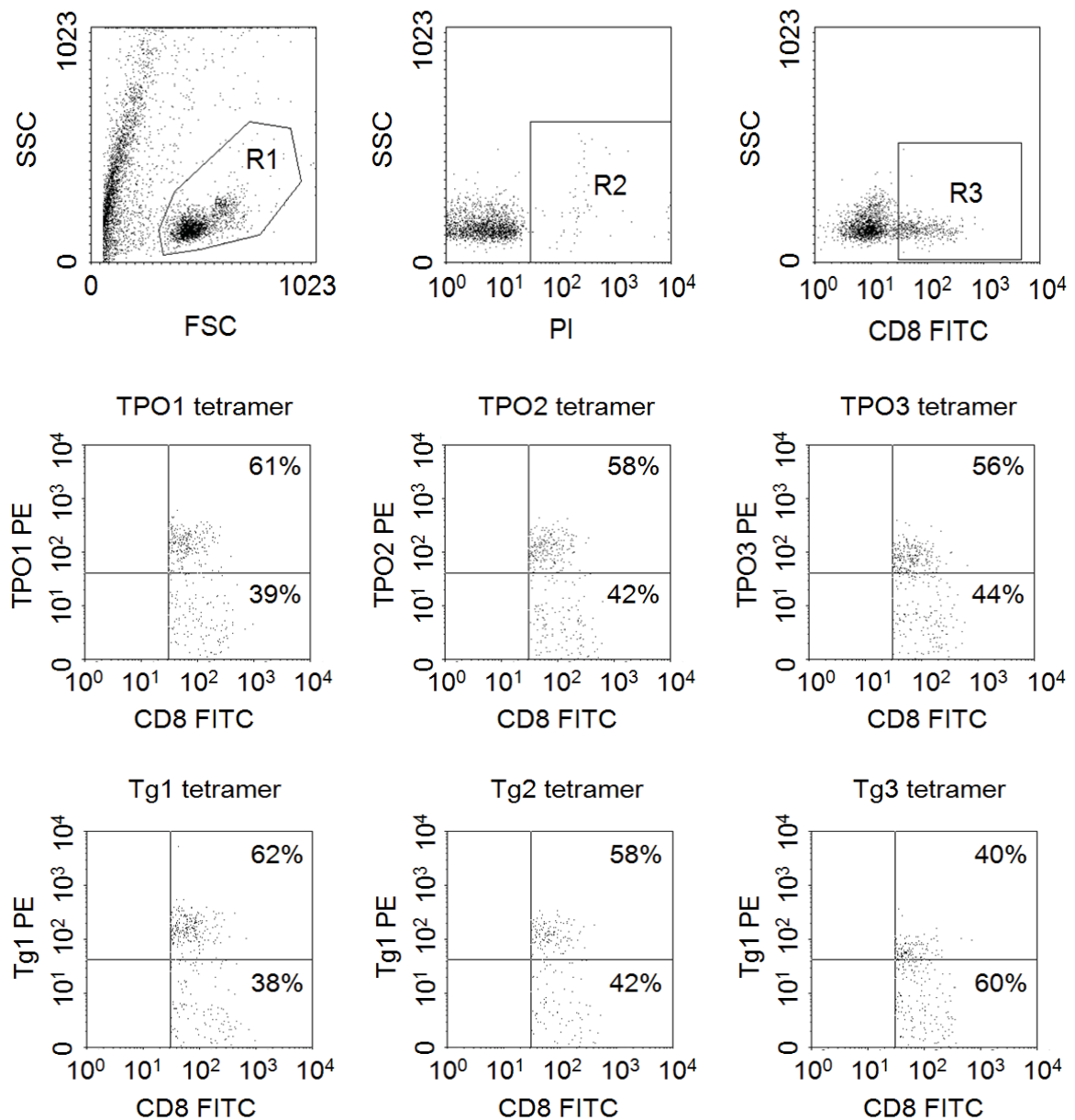
#### Zellen im Blut: HT-Patienten vs. Kontrollgruppen

HT-Patienten hatten die höchste Anzahl an TPO- und Tg-epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut, wobei keines der beiden Hauptantigene eindeutig dominierte.

Um die epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren venösen Blut der HLA-A2<sup>+</sup> HT-Patienten ( $n = 37$ ), im Vergleich zu den drei Kontrollgruppen, zu quantifizieren, wurden CD8<sup>+</sup> Zellen aus dem venösen Blut isoliert, mit Tetrameren gefärbt (je drei Epitope von TPO und Tg) und mittels Durchflusszytometrie gemessen (Abb. 10). Zu den Kontrollgruppen gehörten: 3 HLA-A2<sup>-</sup> Hashimoto-Patienten, 16 HLA-A2<sup>+</sup> nicht-autoimmunkranke Struma-Patienten und 10 HLA-A2<sup>+</sup> gesunde Kontrollen.

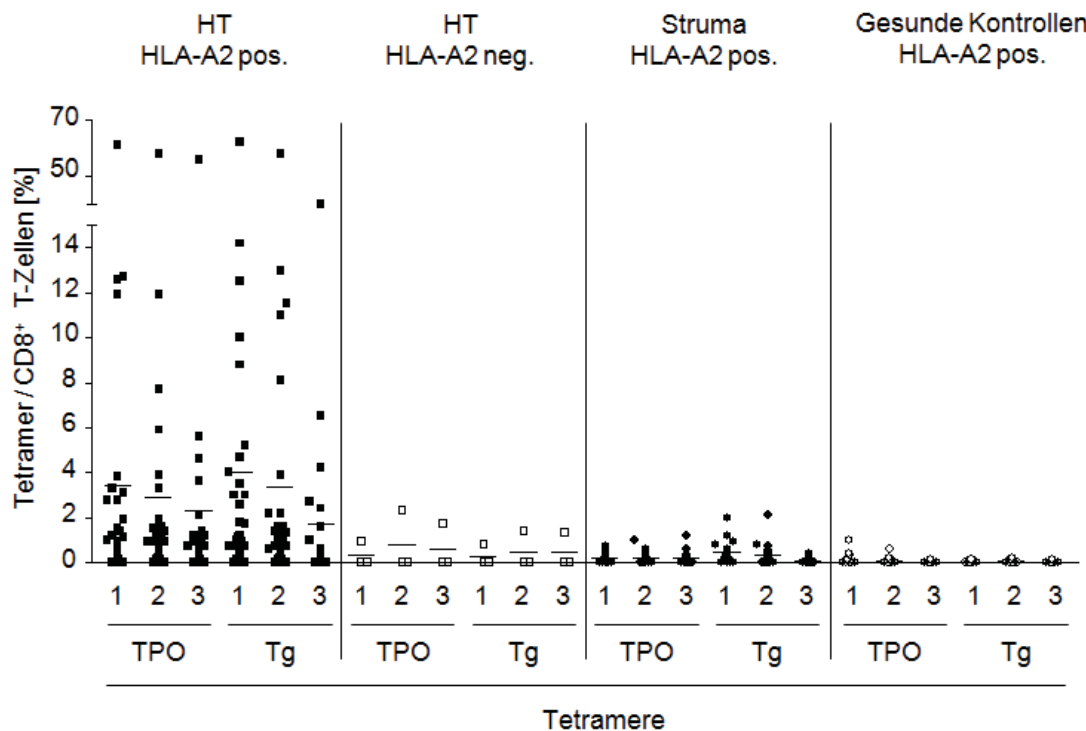
Unabhängig vom untersuchten Tetramer, war die Anzahl der peripheren TPO- und Tg-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei HLA-A2<sup>+</sup> HT-Patienten mit  $2,8\% \pm 9,5\%$  von allen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, signifikant höher, als bei allen anderen Kontrollgruppen: HLA-A2<sup>-</sup> HT-Patienten ( $0,5\% \pm 0,7\%$ ,  $p = 0,007$ ), HLA-A2<sup>+</sup> Struma-Patienten ( $0,2\% \pm 0,4\%$ ,  $p < 0,0001$ ) und HLA-A2<sup>+</sup> gesunden Kontrollen ( $0,1\% \pm 0,2\%$ ,  $p < 0,0001$ ) (Abb. 11). Innerhalb der Experimentalgruppe der 37 HLA-A2<sup>+</sup> Hashimoto-Patienten gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Anzahl der TPO-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu der Anzahl der Tg-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Durchschnittlich konnten pro Hashimoto-Patient  $2,9\% \pm 9,6\%$  TPO-spezifische- und  $3,0\% \pm 9,0\%$  Tg-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfasst werden. Bei fünf dieser Patienten konnten mehr als 10% aller peripheren CD8<sup>+</sup> T-Zellen Thyreoglobulin als spezifisches Zielmolekül erkennen. Die Ergebnisse bestätigen somit eindeutig, dass Hashimoto-Patienten signifikant erhöhte TPO- und Tg-epitopspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut haben, während die Thyreoperoxidase- und Thyreoglobulin-Epitope, bis auf wenige Ausnahmen, fast gleichermaßen erkannt werden.





**Abb. 10: Repräsentative Tetramer-Analyse von TPO- und Tg-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen eines Hashimoto-Patienten mittels Durchflusszytometrie**

Aus dem Blut eines Hashimoto-Patienten wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen isoliert und mit 6 Epitopen von Thyreoperoxidase (TPO 1-3) und Thyreoglobulin (Tg 1-3) gefärbt. Für die FACS-Analyse wurden die Zellen *gated*: R1 = lebendige Zellen im Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreuer (SSC), nicht-R2 = Propidiumiodid-negative, also nicht-nekrotische Zellen sowie R3 = CD8<sup>+</sup> Zellen. Die Bereiche oben rechts zeigen die tetramerpositiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen des jeweilig getesteten TPO-oder Tg-Epitops an.



**Abb. 11: Anzahl der TPO- und Tg-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut von HLA-A2<sup>+</sup> HT-Patienten im Vergleich zu drei Kontrollgruppen**

Tetrameranalysen mit je drei Epitopen von TPO und Tg wurden mit den CD8<sup>+</sup> T-Zellen von 37 HLA-A2<sup>+</sup> HT-Patienten und drei Kontrollgruppen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die HLA-A2<sup>+</sup> HT-Patienten signifikant mehr TPO- und Tg-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen (2,8% ± 9,5%) im peripheren venösen Blut hatten als: 3 HLA-A2<sup>-</sup> HT-Patienten ( $p = 0,007$ ), 16 HLA-A2<sup>+</sup> nicht-autoimmunkranke Strumapatienten ( $p < 0,0001$ ), sowie 10 HLA-A2<sup>+</sup> gesunde Kontrollen ( $p < 0,0001$ ). Es war kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl von TPO- versus Tg-spezifischen T-Zellen bei HLA-A2<sup>+</sup> HT-Patienten eruiert: 2,9% ± 9,6% waren im Durchschnitt TPO-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen und 3,0% ± 9,0% wurden als Tg-spezifisch ermittelt.

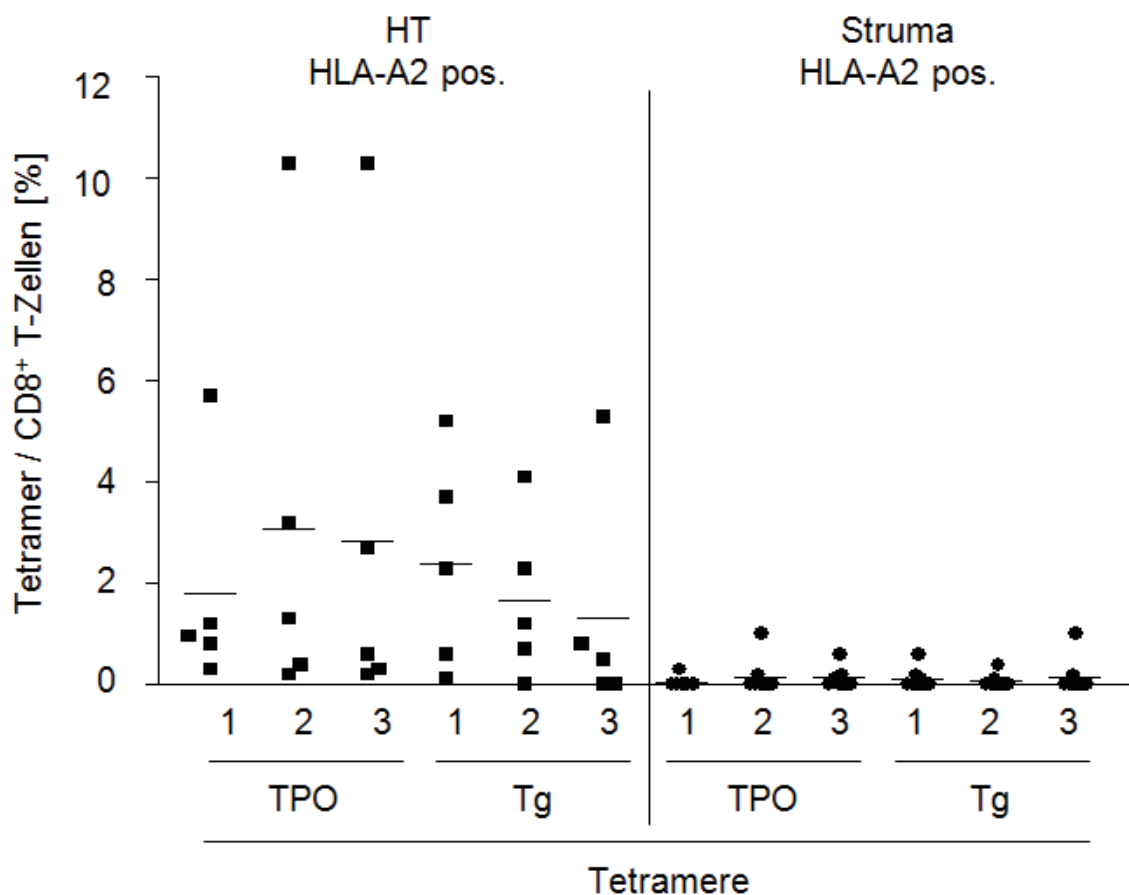
## 4.2 Quantifizierung der TPO- und Tg-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Schilddrüse: HT-Patienten vs. Strumapatienten

HT-Patienten hatten die höchste Anzahl an Thyreoperoxidase- und Thyreoglobulin-epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Schilddrüse, wobei weder TPO noch Tg eindeutig dominierte.

Um zu untersuchen ob HLA-A2<sup>+</sup> HT-Patienten einen ähnlichen Anteil an infiltrierenden epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in ihrer Schilddrüse wie in ihrem peripheren Blut haben, wurden Zellen aus Routine-Schilddrüsenpunktionen zur Tetrameranalyse

verwendet ( $n = 5$ ). Als Kontrollgruppe wurde Punktatmaterial von 7 HLA-A2<sup>+</sup> Struma nodosa-Patienten (Anti-TPO- und Anti-Tg-Antikörper negativ) genutzt.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass HT-Patienten eine signifikant höhere Anzahl an TPO- und Tg-epitopspezifischen Schilddrüsen-infiltrierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen haben, im Vergleich zu nicht-autoimmunerkrankten Struma-Patienten ( $2,2\% \pm 2,8\%$  versus  $0,1\% \pm 0,2\%$ ,  $p < 0,0001$ ) (Abb. 12). Innerhalb der Hashimoto-Gruppe konnten durchschnittlich 58,6% der Schilddrüsen-infiltrierenden epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen Thyreoperoxidase als spezifisches Zielmolekül erkennen, während 41,1% Thyreoglobulin-spezifisch waren. Dies beschreibt eine umgekehrte TPO- vs. Tg-Relation als im Blut der Hashimoto-Patienten. Allerdings unterschied sich die Anzahl an TPO-spezifischen T-Zellen insgesamt nicht signifikant von der Anzahl an Tg-spezifischen T-Zellen (Mittelwerte: TPO  $2,6\% \pm 3,5\%$  versus Tg  $1,8\% \pm 1,9\%$ ), es gab also keine eindeutige Dominanz eines der beiden Hauptantigene bei der Autoimmunität.



**Abb. 12:** Anzahl der TPO- und Tg-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Schilddrüse von Hashimoto-Patienten und Struma-Patienten

Die Infiltration der Schilddrüse durch TPO- und Tg-epitopspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen war bei den 5 HLA-A2<sup>+</sup> HT-Patienten signifikant höher als bei den 7 HLA-A2<sup>+</sup> nicht-

autoimmunerkrankten Struma nodosa-Patienten ( $p < 0,0001$ ). Die Anzahl an TPO-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterschied sich nicht signifikant von den Tg-spezifischen T-Zellen (Mittelwerte: TPO  $2,6\% \pm 3,5\%$  versus Tg  $1,8\% \pm 1,9\%$ ).

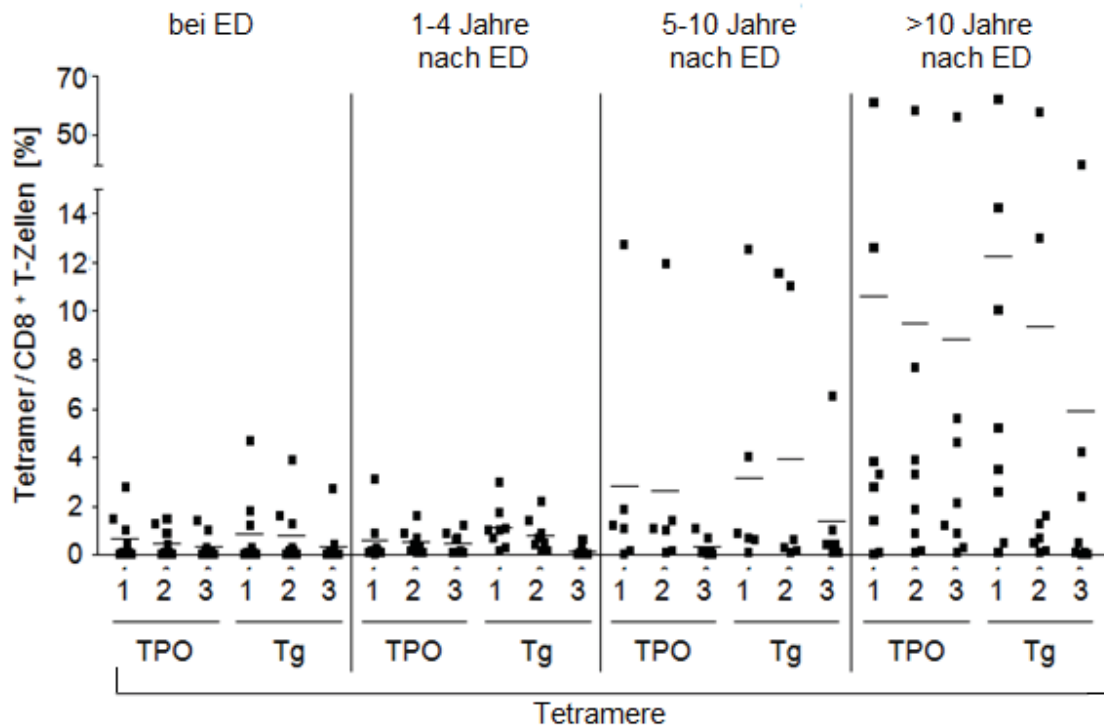
### **4.3 Zusammenhang zwischen der Krankheitsdauer der Hashimoto-Thyreoiditis und der Anzahl der TPO- und Tg-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut**

Mit steigender Krankheitsdauer der Hashimoto-Thyreoiditis, zeigte sich ein Anstieg der Anzahl der TPO- und Tg-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut der Patienten, ohne signifikante Dominanz von TPO oder Tg (Abb. 13).

Um zu untersuchen, ob die Anzahl der TPO- und Tg-epitopspezifischen T-Zellen (ermittelt durch Tetrameranaysen mittels Durchflusszytometrie, siehe Abb.10) einen Zusammenhang zur Krankheitsdauer der Hashimoto-Thyreoiditis zeigt, wurde das Kollektiv der HLA-A2<sup>+</sup> HT-Patienten in vier Gruppen eingeteilt. Abhängig von der Krankheitsdauer seit Erstdiagnose wurde unterschieden: seit weniger als 1 Jahr, seit 1-4 Jahren, seit 5-10 Jahren und seit mehr als 10 Jahren.

Bei der Erstdiagnose hatten HT-Patienten ( $n = 9$ ) im Blut bereits signifikant erhöhte Anzahlen an TPO- und Tg-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (durchschnittlich  $0,6\% \pm 1,0\%$ ) verglichen mit gesunden Kontrollpersonen ( $p < 0,0001$ ). Von diesen epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnten  $41,3\% \pm 35,9\%$  Thyreoperoxidase erkennen, während für  $58,7\% \pm 63,8\%$  Thyreoglobulin das spezifische Zielmolekül war. Die Anzahl der Tg-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen ( $0,7\% \pm 1,3\%$ ) war somit zwar höher als die Anzahl der TPO-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen ( $0,5\% \pm 0,7\%$ ), aber der Unterschied war nicht signifikant. Ein ähnliches Ergebnis hatten HT-Patienten mit einer Krankheitsdauer von 1-4 Jahren ( $n = 8$ , Mittelwert:  $0,6\% \pm 0,7\%$ ). Einen eindeutigen und signifikanten Anstieg an TPO- und Tg-epitopspezifischen T-Zellen zeigte sich nach 5-10 Jahren Krankheitsdauer ( $2,4\% \pm 4\%$ ,  $n = 6$ ) oder mehr als 10 Jahren ( $9,4\% \pm 18,3\%$ ,  $n = 8$ ). Hashimoto-Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als 10 Jahren hatten große Mengen an epitopspezifischen autoreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen, davon waren  $9,7\% \pm 19,1\%$  spezifisch für Thyreoperoxidase und  $9,2\% \pm 17,9\%$  für Thyreoglobulin. Der Vergleich der epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Gruppe bei Erstdiagnose mit der Gruppe mit über 10 Jahren Krankheitsdauer stellte signifikante Unterschiede dar ( $p = 0,0052$ ). Unabhängig vom Diagnosezeitpunkt, verteilte sich die Epitopspezifität für

TPO versus Tg innerhalb aller gemessenen autoreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit 48,6% versus 51,4%. Die Subgruppenanalyse je nach Krankheitsdauer der Hashimoto-Thyreoiditis offenbarte einen stetigen Anstieg der autoreaktiven TPO- und Tg-spezifischen T-Zellen im Verlauf der Krankheit, aber keinen signifikanten Unterschied zwischen TPO und Tg (Abb. 13).



**Abb. 13: Anstieg der TPO- und Tg-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im zeitlichen Verlauf der Hashimoto-Thyreoiditis**

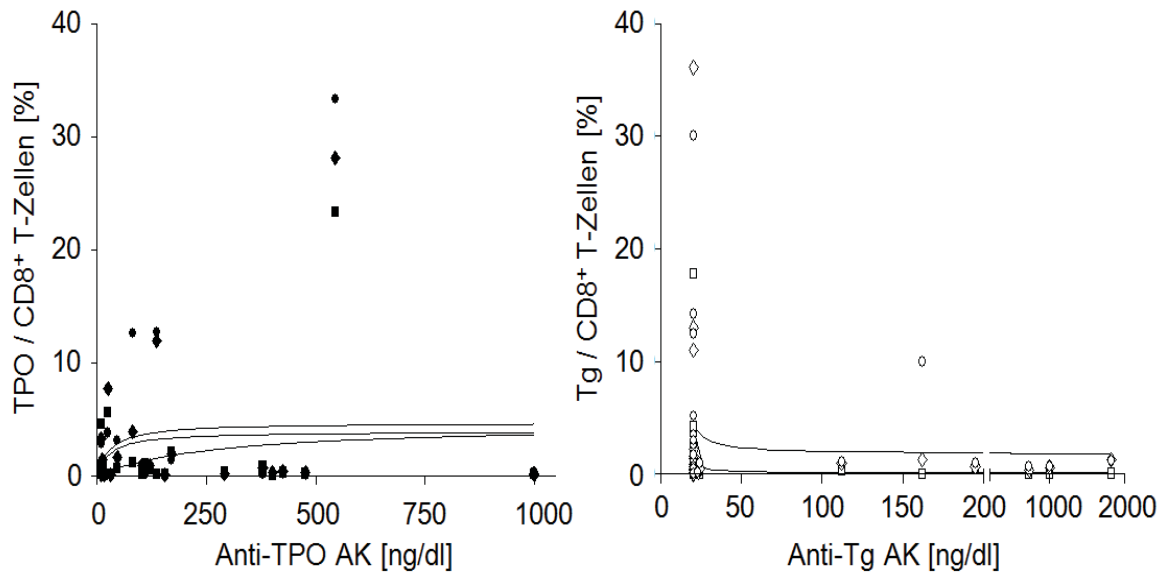
Die Anzahl von TPO- und Tg-spezifischen autoreaktiven T-Zellen im Blut von HT-Patienten wurde mittels Tetrameranalyse mit 6 Epitopen für Thyreoperoxidase (TPO 1-3) und Thyreoglobulin (Tg 1-3) ermittelt. Subgruppenanalysen der HT-Patienten je nach Krankheitsdauer ab Erstdiagnose (seit weniger als 1 Jahr, seit 1-4 Jahren, seit 5-10 Jahren und seit mehr als 10 Jahren) offenbarte einen signifikanter Anstieg der autoreaktiven TPO- und Tg-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Krankheitsverlauf, ohne signifikante Dominanz von TPO oder Tg. Besonders eindeutig war der Anstieg nach 5-10 Jahren ( $2,4\% \pm 4\%$ ,  $n = 6$ ) und mehr als 10 Jahren ( $9,4\% \pm 18,3\%$ ,  $n = 8$ ).

#### **4.4 Zusammenhang zwischen Autoantikörpern und TPO- und Tg-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Hashimoto-Patienten**

Die Anzahl der TPO- und Tg-epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut von Hashimoto-Patienten zeigte keinen Zusammenhang zur Höhe der Serumautoantikörper Anti-TPO und Anti-Tg.

Um zu untersuchen, ob HT-Patienten mit hohen Titern an Serumautoantikörpern auch gleichermaßen erhöhte Anzahlen an epitopspezifischen T-Zellen im Blut haben, wurden die Ergebnisse der Tetrameranalysen der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (siehe Abb. 10) mit den Titern der Serumautoantikörper verglichen, die im Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Universitätsklinik Düsseldorf gemessenen wurden.

Wie Abbildung 14 zeigt, gab es keine erkennbare Korrelation - weder für Thyreoperoxidase, noch für Thyreoglobulin. Alle Pearsons r-Werte waren niedrig: von -0,14 (für Tg1) bis zu 0,14 (für TPO3). Das bedeutet, dass ein Hashimoto-Patient, der hohe Anti-TPO-Serumantikörper aufweist, nicht zwingend auch eine hohe Anzahl an TPO-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut haben muss. Genauso wenig konnte eine Kreuzreaktivität nachgewiesen werden: Patienten mit hohen Anti-TPO-Antikörpertitern zeigten keine Erhöhung der Tg-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut. Es konnte somit insgesamt kein direkter Zusammenhang zwischen Autoantikörpern und autoreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden.



**Abb. 14: Zusammenhang zwischen Schilddrüsenautoantikörpern und epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Hashimoto-Patienten**

Die Serum-TPO- und Tg-Autoantikörper wurden verglichen mit der Anzahl der TPO- und Tg-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut von HT-Patienten (gemessen mittels Tetrameranalysen mit 6 TPO- und Tg-Epitopen). Eine Pearsons Korrelationsanalyse zeigte diesbezüglich keinerlei Korrelation.

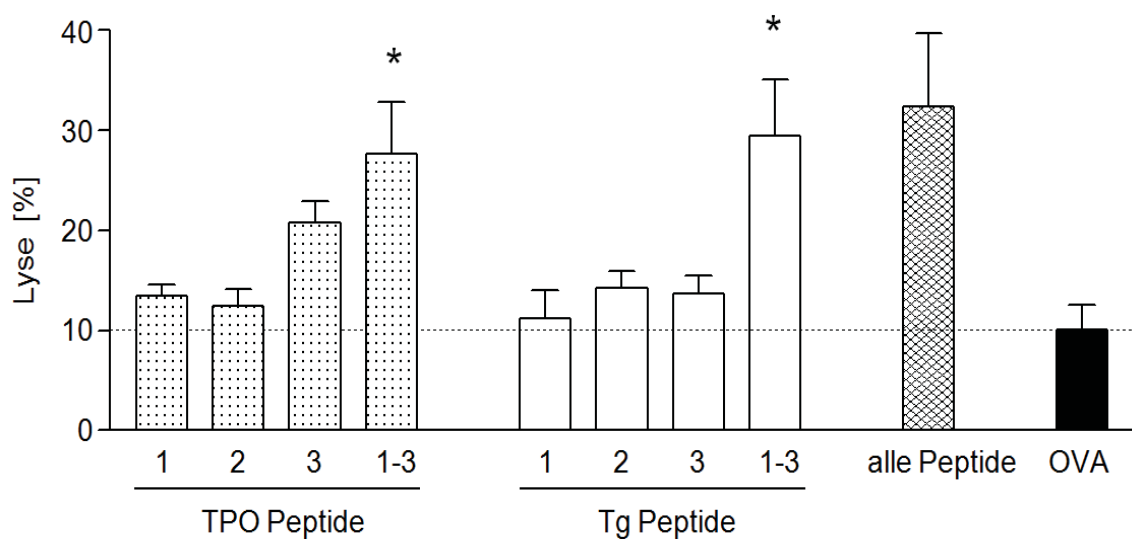
#### 4.5 Zytotoxizitätstest: Unterschiedliche epitopspezifische Lysekapazität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem Blut von HT-Patienten

Die höchste Lyserate durch epitopspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem Blut von Hashimoto-Patienten wurde evoziert durch das Peptidepitop TPO 3 sowie die Kombination aller Thyreoglobulin-Epitope (Tg 1+2+3).

Um die Lysekapazität der autoreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu analysieren, wurden Zytotoxizitätstests durchgeführt. Dafür wurden Monozyten mit je einem von sechs verschiedenen TPO- und Tg-Peptiden (TPO 1-3 und Tg 1-3) gepulst und mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen (isoliert aus dem peripheren venösen Blut von HT-Patienten) über Nacht kokultiviert. Auch Peptidkombinationen, wie TPO 1+2+3 und Tg 1+2+3, sowie alle 6 Peptid epitope gleichzeitig, wurden getestet. Die durch Lyse entstandenen nekrotischen Monozyten wurden mittels Annexin V/Propidiumiodid-Färbung am Durchflusszytometriegerät dargestellt.

Eine signifikante Induktion der Lyse durch autoreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde nachgewiesen für TPO 3 ( $p = 0,0219$ ) und Tg 1+2+3 ( $29,4\% \pm 12,6\%$ ,  $p = 0,0465$ )

(Abb. 15). Die simultane Inkubation mit allen TPO-Peptiden (TPO 1+2+3) führte zu einer Lyse von  $27,7\% \pm 12,7\%$ . Die Lyseraten durch epitopspezifische autoreaktive  $CD8^+$  T-Zellen waren im Durchschnitt dreimal stärker als nach Inkubation mit dem Kontrollprotein Ovalbumin, welches als Negativkontrolle verwendet wurde ( $p = 0,0465$  für Tg-spezifische T-Zellen).  $CD8^+$  T-Zellen und Monozyten, die mit allen sechs Peptiden gleichzeitig gepulst worden waren, erreichten sogar höhere Lysekapazitäten von  $32,4\% \pm 19,4\%$ .



**Abb. 15: Vergleich der Zytotoxizität durch  $CD8^+$  T-Zellen von Hashimoto-Patienten bezüglich 6 verschiedenen TPO- und Tg-Epitopen**

Die Lysekapazität von autoreaktiven  $CD8^+$  T-Zellen gegenüber reifen Monozyten (als Zielzellen) wurde mittels Annexin V/Propidiumiodid-Färbung in der Durchflusszytometrie dargestellt. Die T-Zellen und Monozyten wurden in Kultur Peptid-gepulst mit je einem Epitop von Thyreoperoxidase oder Thyreoglobulin, mit TPO 1+2+3, mit Tg 1+2+3 sowie simultan mit allen 6 Epitopen (TPO und Tg gemischt). Eine signifikante Induktion der Lyse wurde für TPO 3 ( $p = 0,0219$ ) und Tg 1+2+3 ( $p = 0,0465$ ) nachgewiesen. Ovalbumin (OVA) diente als Negativkontrolle.



## 5 DISKUSSION

In dieser Dissertation konnte nachgewiesen werden, dass Hashimoto-Thyreoiditis Patienten sowohl im Blut als auch in der Schilddrüse signifikant hohe Mengen an Thyreoperoxidase- und Thyreoglobulin-epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen haben, ohne signifikante Dominanz eines der beiden Antigene. Die Anzahl der autoreaktiven T-Zellen steigt im Krankheitsverlauf an. Sie sind auch in der Lage, *in vitro* Zellen zu lysieren, wobei verschiedene TPO- und Tg-Epitope unterschiedlich starke Lyseraten induzieren. Es zeigte sich keine Korrelation dieser autoreaktiven T-Zellen zu den Autoantikörpern Anti-TPO und Anti-Tg.

Methodisch wurde dieses Projekt wesentlich mithilfe von Tetrameranalysen mit sechs TPO- und Tg-Epitopen umgesetzt und mittels Durchflusszytometrie gemessen. CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus dem Blut und aus Schilddrüsenpunktaten von HT-Patienten isoliert. In dieser Population wurde dann die Quantität der TPO- bzw. Tg-epitopspezifischen Zellen untersucht. Zu den 66 Studienteilnehmern gehörten 37 HLA-A2<sup>+</sup> HT-Patienten, sowie drei Kontrollgruppen (HLA-A2<sup>-</sup> HT-Patienten, HLA-A2<sup>+</sup> Strumapatienten, HLA-A2<sup>+</sup> gesunde Personen).

Nach aktuellem Wissenschaftsstand konnte bislang nicht endgültig geklärt werden, ob Thyreoperoxidase oder Thyreoglobulin das autoimmune Hauptziel bei der Hashimoto-Thyreoiditis ist und welches Antigen das initiale Zielantigen ist.

### 5.1 Autoimmunes Hauptziel: TPO versus Tg

Da 95% der Hashimoto-Patienten TPO-Antikörper haben, aber nur 70% Anti-Tg positiv sind, wurde vermutet, dass TPO das primäre Ziel der Autoimmunität ist (85). Außerdem konnten Huber et al. einen signifikanten Zusammenhang von Anti-TPO-Antikörpern zur Entwicklung einer manifesten Hypothyreose feststellen. Interessanterweise hatten im Gegensatz dazu Anti-Tg-Antikörper keinen prädiktiven Aussagewert für die Entwicklung einer Hypothyreose (21). Auch die NHANES III-Studie, als Querschnitt der Bevölkerung in den USA von 1988 bis 1994, demonstrierte, dass ein alleiniges Auftreten von Tg-Autoantikörpern im Serum, im Gegensatz zu TPO-Antikörpern, nicht mit einer Schilddrüsendysfunktion assoziiert werden konnte (86).

Chen et al. schilderten 2010 in einer Studie mit vier Patienten mit juveniler Hashimoto-Thyreoiditis und deren Familien, dass zuerst Tg-Autoantikörper und dann TPO-AK im Serum auftraten. Sobald im Verlauf dann beide Antikörper positiv wurden, dominierte der Anti-TPO-Titer (87). Damit übereinstimmend zeigte auch diese Arbeit, dass die Hashimoto-Patienten am Zeitpunkt der klinischen Krankheitsmanifestation eine höhere Anzahl an Thyreoglobulin-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aufwiesen, allerdings war der Unterschied zwischen TPO und Tg nicht statistisch signifikant. Es bedarf künftig weiterer Studien, um endgültig zu klären, welches Antigen zuerst zur autoimmunen Zielstruktur bei der Hashimoto-Thyreoiditis wird.

Für die Erforschung dieser Problemstellung wurde bereits ein Tiermodell analog zur humanen HT entwickelt, als sogenannte Experimentelle Autoimmunthyreoiditis (EAT-Tiermodell). Brazillet et al. konnten durch eine intravenöse Injektion von hitzedenaturiertem porcinem Thyreoglobulin ohne Adjuvantien eine EAT bei Mäusen induzieren (88). Dies wurde auch unter anderem durch Tomer et al. bestätigt (26). Andere Studien bewiesen wiederum, dass eine EAT auch mittels Thyreoperoxidase-Immunisierung der Mäuse ausgelöst werden kann (89). Insgesamt lässt sich aus der Studienlage schließen, dass eine Experimentelle Autoimmunthyreoiditis sowohl durch TPO als auch durch Tg evoziert werden kann.

In dieser Arbeit konnte deutlich gemacht werden, dass HT-Patienten im Blut und in der Schilddrüse signifikante Mengen an TPO- und Tg-epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen haben, ohne signifikante Dominanz eines der beiden Strukturen. Thyreoperoxidase und Thyreoglobulin scheinen gleichwertige Hauptziele der Autoimmunität zu sein und parallel zu entstehen. Eine Begründung dieser These scheinen McLachlan et al. schon 1989 gefunden zu haben. Sie veröffentlichten, dass die Gene von TPO und Tg eine gemeinsame Aminosäuresequenz aufweisen, sich somit gemeinsame T-Zell-Epitope teilen und deshalb die Autoantikörper Anti-TPO und Anti-Tg gleichzeitig entstehen (90). Dieses Ergebnis könnte auch erklären, warum die Zytotoxizitätstest dieser Dissertation Unterschiede in der Lyserate zeigten. Dass TPO3-Peptid-gepulste Zellen eine signifikante Lyse induzierten, könnte daran liegen, dass 9 Aminosäuren (ALSEDLISI) vom TPO3-Peptid mit einem geteilten T-Zell-Epitop zwischen Thyreoperoxidase und Thyreoglobulin übereinstimmen. Dies unterstreicht die These der gleichwertigen Hauptziele TPO und Tg.

Hervorzuheben ist weiterhin, dass die Anzahl und die Epitopverteilung der TPO- und Tg-spezifischen T-Zellen im Blut der Hashimoto-Patienten sehr ähnlich wie in der

Schilddrüse, dem autoimmunen Zielorgan, waren. Ein analoges Ergebnis beschrieb auch die Wong-Arbeitsgruppe im Rahmen eines Mausmodells für Typ 1 Diabetes mellitus, welches eine Konformität der Menge und der Epitopspezifität der autoreaktiven Zellen im Blut und in den Pankreasinseln aufzeigte (91).

## 5.2 Anti-TPO und Anti-Tg: nur ein Epiphänomen?

Es gibt viele Kontroversen über die Rolle der Autoantikörper Anti-TPO und Anti-Tg und deren Zusammenhang zu den autoreaktiven T-Zellen. Umstritten ist hierbei vor allem die Relevanz der Autoantikörper bezüglich der Krankheitsinitiation und ihres Progresses.

Beim Morbus Basedow ist die Rolle der Autoantikörper, im Gegensatz zur Hashimoto-Thyreoiditis, sehr gut erforscht. Die Anti-TSH-Rezeptor-Antikörper (TRAK) haben einen direkten Einfluss auf die Pathogenese, sie haben eine stimulierende Funktion auf die Thyreozyten, es kommt zur Hypertrophie und Hyperthyreose. Laut Rapoport und McLachlan beeinflussen die TPO-Autoantikörper nicht die enzymatische Aktivität von Thyreoperoxidase (92).

Ob die Autoantikörper bei der Hashimoto-Thyreoiditis mittels Antikörper-vermittelter Zytotoxizität die Pathogenese beeinflussen oder einfach nur eine immunologische Begleiterscheinung der Krankheit sind, konnte bislang nicht gänzlich geklärt werden. Die Mehrheit der Studien postuliert eher Letzteres (2). In dieser Dissertation konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass es keinerlei Korrelation zwischen der Höhe der Serumautoantikörper und der Anzahl der TPO- und Tg-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut von HT-Patienten gibt. Ebenso stellten Mariotti et al. in ihrer Studie fest, dass hypothyreote Hashimoto-Patienten zwar signifikant hohe Anti-TPO-AK im Blut haben, es dabei aber keine direkte Korrelation zwischen der Titerhöhe und der Schilddrüsenfunktion der Patienten gab. Interessanterweise sank der Antikörpertiter unter Therapie mit L-Thyroxin (85).

Ein bedeutsames Argument, dass die Autoantikörper Anti-TPO und Anti-Tg bei der Krankheitsgenese der HT keinerlei Bedeutung haben, ist das Vorkommen dieser Autoantikörper auch bei gesunden Individuen (25,54).

Laut „*National Health and Nutrition Examination Survey III* Studie“ waren sogar über 10% der gesunden Untersuchten Autoantikörper-positiv (16). Mariotti et al. konnten

ergänzen, dass es einen altersabhängigen Anstieg der Prävalenz von Schilddrüsenautoantikörpern in gesunden Individuen gibt. Untersucht wurden dafür Kontrollgruppen zwischen 7-85 sowie 100-108 Jahren (93). Hollowell et al. beschrieben ebenfalls, dass die Prävalenz der Autoantikörper Anti-TPO und Anti-Tg in der US-Bevölkerung ansteigend mit dem Alter und signifikant höher bei Frauen war, sowie höher bei Weißen und Mexikanischen Amerikanern als bei Schwarzen (86).

Andererseits könnte es auch Unterschiede zwischen den Autoantikörpern von gesunden Individuen, im Vergleich zu denen von Autoimmunthyreoiditis-Erkrankten (AIT) geben. 2008 beschrieben Latrofa et al., dass sie unterschiedliche Epitop-Erkennungsmuster der Thyreoglobulin-Autoantikörper von AIT-Erkrankten (Hashimoto-Thyreoiditis und M. Basedow) im Vergleich zu nicht-AIT-Erkrankten (Struma nodosa und papilläres Schilddrüsenkarzinom) entdeckt haben (94). Hinzu kommt, dass einige Studien auch Argumente liefern, dass es sich bei den Autoantikörpern nicht nur um ein Epiphänomen handeln könnte. Rebuffat et al. veröffentlichten 2008 eine Studie, die zeigte, dass humane TPO-Antikörper, die aus dem Serum von Basedow-Patienten isoliert wurden, humane Thyreozyten *in vitro* zerstörten, im Rahmen einer Antikörper-vermittelten und einer Komplement-aktivierenden Zytotoxizität. Dabei hatte der Komplementfaktor C1 an den TPO-Antikörperkomplex auf den Thyreozyten gebunden und eine Signalkaskade bis zum Membranangriffskomplex (C5b-9) ausgelöst, was mittels Durchflusszytometrie und Chrom-Release-Assay nachgewiesen werden konnte. Tg-Antikörper waren allerdings nicht in der Lage Komplement zu binden (25,95). Die von Blanchin et al. 2003 veröffentlichten Ergebnisse könnten die These der Antikörper-vermittelten Zytotoxizität wiederum entkräften, denn sie fanden heraus, dass der Komplementfaktor C4 auch direkt an TPO binden und Zytotoxizität auslösen kann, unabhängig von TPO-Autoantikörpern (96).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die große Mehrheit der Studien über Hashimoto-Thyreoiditis, analog zu den Ergebnissen dieser Doktorarbeit, eindeutig belegen, dass die Autoantikörper Anti-TPO und Anti-Tg nur als ein Epiphänomen der Erkrankung anzusehen sind, ohne Bedeutung für die Pathogenese. Unabhängig davon, sind die Autoantikörper für die Diagnostik der Hashimoto-Thyreoiditis unabhkömmlich.

### 5.3 HT: eine CD8<sup>+</sup> T-Zell-vermittelte Erkrankung

Im Gegensatz zu den Kontroversen bezüglich der Rolle der Autoantikörper, ist weitgehend anerkannt, dass die HT eine T-Zell-vermittelte Erkrankung ist. Um zu zeigen, dass es sich dabei wesentlich um CD8<sup>+</sup>- und nicht um CD4<sup>+</sup> T-Zellen handelt, zeigten Brazillet et al. bereits 1999 an einem Mausmodell mit Thyreoglobulin-induzierter EAT, dass die Erkrankung nach Depletion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht ausgelöst werden konnte, während die Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu einer etwas mildereren EAT führte (88). Weiterhin fanden sie heraus, dass es sich hierbei um MHC-Klasse I-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen vom Tc1-Typ handelt, welche vor allem INF- $\gamma$  sezernieren und Apoptose mithilfe von Perforin oder Fas/FasL induzieren (52,88). Dabei konnte die tragende Rolle des INF- $\gamma$  bei der EAT dargestellt werden: Mäuse in denen INF- $\gamma$  durch neutralisierende Antikörper funktionsuntauglich gemacht wurde, entwickelten keine EAT (88). Mazziotti et al. beschrieben 2003, dass periphere CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Hashimoto-Patienten mit Hypothyreose, eine Typ 1-Aktivierung zeigten mit INF- $\gamma$ -Sekretion, welches für Gewebszerstörung und Krankheitsprogress verantwortlich ist. Euthyreote HT-Patienten zeigten dagegen eine erhöhte IL-4-Sekretion durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen, entsprechend eines Typ 2-Zytokinprofils (IL4, IL5, IL10), was mit einer Krankheitsregression und einer Suppression von Immunreaktionen in Verbindung gebracht werden konnte. Die Typ 1-Reaktion ist bedeutend für die Regulation von zellvermittelten Immunantworten, während die Typ 2-Reaktion die Antikörperproduktion moduliert und teilweise immunsupprimierend wirkt (97). Ein weiteres Beispiel für die Bedeutung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Autoimmunkrankheiten zeigte eine Studie über die Prävention von Autoimmundiabetes in NOD-Mäusen und BB-Ratten mittels Anti-CD8<sup>+</sup> Behandlung (88).

Quaratino et al. konnten 2004 mithilfe eines transgenen Mausmodells mit TAZ10-Mäusen bestätigen, dass die Hashimoto-Thyreoiditis eine rein T-Zell-vermittelte Erkrankung ist und die Autoantikörper gegen TPO und Tg keine Rolle bei der Pathogenese spielen (1). TAZ10-Mäuse tragen auf ihren CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen den humanen T-Zell-Rezeptor, welcher von einer Schilddrüsen-infiltrierenden TPO-epitopspezifischen T-Zelle eines Hashimoto-Patienten abgeleitet wurde. Die TAZ10-Mäuse waren Rag1<sup>-/-</sup>-Mäuse, sie waren also genetisch T- und B-Zell-defizient.

In Abwesenheit von B-Zellen und somit auch von Autoantikörpern, entwickelten alle Mäuse spontan eine EAT, analog zu einer klassischen humanen Hashimoto-Thyreoiditis. Es kam zu einer Thyreozytendestruktion durch Apoptoseinduktion mittels

TPO-spezifischer T-Zellen und im Endstadium entstanden auch hier eine Hypothyreose (gemessen an einer TSH-Erhöhung und einem T3- und T4-Hormonmangel) sowie eine Gewichtszunahme der Mäuse. Die Besonderheit dieses Mausmodells im Vergleich zu anderen experimentellen Thyreoiditis-Modellen war zum einen die spontane EAT-Entstehung in den TAZ10-Mäusen, ohne vorangegangene Immunisierung mittels TPO- oder Tg-Epitopen, und zum anderen die Abwesenheit von Autoantikörpern durch die genetische B-Zelldefizienz (1,18). Allerdings konnte nicht ausreichend geklärt werden, wie groß die Gewichtung der Zytokinsekretion durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zur CD8<sup>+</sup> T-Zell-vermittelten Zytotoxizität bei der Thyreozytendestruktion ist (1,18). Weiterhin fraglich war, welche Zellen die TPO-Epitope präsentiert haben, da B-Zellen nicht in diesem Modell vorhanden waren (1,18). Andere Studien postulierten, dass die Thyreozyten selbst für die Antigen-Präsentation von TPO-Epitopen (und Tg) auf MHC-II-Molekülen verantwortlich sind (55,98).

In einem Folgemodell mit TAZ10-Mäusen, die auch den transgenen T-Zell-Rezeptor trugen, aber Rag1<sup>+</sup> (nicht genetisch T-Zell-defizient) waren, konnte ergänzt werden, dass die spontane Hashimoto-Entstehung der Mäuse mit einer signifikanten Reduktion von Regulatorischen T-Zellen (CD4<sup>+</sup> und CD25<sup>+</sup>) einherging. Regulatorische T-Zellen sind dafür bekannt, Immunreaktionen zu inhibieren und somit Autoimmunität zu verhindern (99).

#### **5.4 Hashimoto-Krankheitsdauer und die autoreaktiven T-Zellen**

Ein weiteres Schlüsselergebnis dieser Doktorarbeit wirft interessante Fragen auf. Mit steigender Krankheitsdauer der Hashimoto-Thyreoiditis stieg auch die Anzahl der Thyreoperoxidase- und Thyreoglobulin-epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen an, sodass HT-Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als zehn Jahren sehr hohe Anzahlen dieser autoreaktiven T-Zellen im Blut hatten. Daraus lässt sich schließen, dass die T-Zellen nicht nur für die Initiation der Krankheit, sondern auch für deren Aufrechterhaltung und Progress verantwortlich sind.

## 6 SCHLUSSFOLGERUNG

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Dissertation, dass die zelluläre Autoimmunreaktion bei der Hashimoto-Thyreoiditis nicht nur - wie bisher weitgehend angenommen - gegen Thyreoglobulin sondern auch gegen Thyreoperoxidase gerichtet ist. Beide Moleküle kommen selektiv in der Schilddrüse vor und stellen gleichwertige Ziele für die autoreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen der HT-Patienten dar. Tg- und TPO-autoreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind gleichermaßen in der Schilddrüse und im Blut der Patienten nachweisbar. Sie sind bereits bei der klinischen Krankheitsmanifestation signifikant erhöht (im Vergleich zu den Kontrollgruppen) und steigen mit zunehmender Krankheitsdauer stetig an. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Tg- und TPO-epitopspezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowohl für die Krankheitsinitiation, als auch für deren Progress verantwortlich sind. Dass es keinerlei Korrelation zwischen den Autoantikörpern Anti-TPO und Anti-Tg zu der Anzahl der epitopspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen gab, lässt schließen, dass die humorale Autoimmunantwort und die zelluläre Immunantwort voneinander unabhängige Komponenten der HT sind. Alles deutet darauf hin, dass es sich bei den Autoantikörpern nur um ein Epiphänomen handelt.

In dieser Dissertation konnte erstmalig demonstriert werden, dass sowohl das Tg als auch die TPO gleichwertige Zielstrukturen für die Autoimmunreaktion der HT darstellen. Tg- und TPO-epitopspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen kommen parallel und gleichermaßen im peripheren Blut und lymphozytären Infiltrat der Schilddrüse von HT-Patienten vor. Es bleibt offen, ob das Immunsystem der Patienten sich zuerst gegen TPO oder gegen Tg richtet. Diese Arbeit leistet einen Beitrag zum Verständnis der Schilddrüsen-spezifischen Autoimmunreaktion bei der Hashimoto-Thyreoiditis.



## 7 LITERATUR UND QUELLEN

1. Quaratino S, Badami E, Pang YY, Bartok I, Dyson J, Kioussis D, u. a. Degenerate self-reactive human T-cell receptor causes spontaneous autoimmune disease in mice. *Nature Medicine*. 15. August 2004;10(9):920–6.
2. Hadj-Kacem H, Rebuffat S, Mnif-Féki M, Belguith-Maalej S, Ayadi H, Péraldi-Roux S. Autoimmune thyroid diseases: genetic susceptibility of thyroid-specific genes and thyroid autoantigens contributions. *Int. J. Immunogenet.* April 2009;36(2):85–96.
3. Armengol MP, Juan M, Lucas-Martín A, Fernández-Figueras MT, Jaraquemada D, Gallart T, u. a. Thyroid autoimmune disease: demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers. *Am. J. Pathol.* September 2001;159(3):861–73.
4. Fisfalen ME, Soliman M, Okamoto Y, Soltani K, DeGroot LJ. Proliferative responses of T-cells to thyroid antigens and synthetic thyroid peroxidase peptides in autoimmune thyroid disease. *JCEM*. 1. Mai 1995;80(5):1597–604.
5. Wang J, Zhang W, Liu H, Wang D, Wang W, Li Y, u. a. Parvovirus B19 infection associated with Hashimoto's thyroiditis in adults. *Journal of Infection*. Mai 2010;60(5):360–70.
6. Rose NR, Bonita R, Burek CL. Iodine: an environmental trigger of thyroiditis. *Autoimmunity Reviews*. Februar 2002;1(1–2):97–103.
7. Lorini R, Gastaldi R, Traggiai C, Perucchin PP. Hashimoto's Thyroiditis. *Pediatr Endocrinol Rev.* Dezember 2003;1 Suppl 2:205–211; discussion 211.
8. Herold G, Und Mitarbeiter. *Innere Medizin*. 2011. Aufl. Gerd Herold;
9. Jacobson EM, Tomer Y. The Genetic Basis of Thyroid Autoimmunity. *Thyroid*. Oktober 2007;17(10):949–61.
10. Paknys G, Kondrotas AJ, Kevelaitis E. [Risk factors and pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis]. *Medicina (Kaunas)*. 2009;45(7):574–83.
11. Fink H, Hintze G. [Autoimmune thyroiditis (Hashimoto's thyroiditis): current diagnostics and therapy]. *Med. Klin. (Munich)*. Juli 2010;105(7):485–93.
12. Mori K, Yoshida K. Viral infection in induction of Hashimoto's thyroiditis: a key player or just a bystander? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. Oktober 2010;17(5):418–24.
13. Lehmann HW, Lutterbüse N, Plentz A, Akkurt I, Albers N, Hauffa BP, u. a. Association of Parvovirus B19 Infection and Hashimoto's Thyroiditis in Children. *Viral Immunology*. September 2008;21(3):379–84.



14. Adamson LA, Fowler LJ, Clare-Salzler MJ, Hobbs JA. Parvovirus B19 Infection in Hashimoto's Thyroiditis, Papillary Thyroid Carcinoma, and Anaplastic Thyroid Carcinoma. *Thyroid*. April 2011;21(4):411–7.
15. Moffatt S, Tanaka N, Tada K, Nose M, Nakamura M, Muraoka O, u. a. A cytotoxic nonstructural protein, NS1, of human parvovirus B19 induces activation of interleukin-6 gene expression. *J. Virol.* Dezember 1996;70(12):8485–91.
16. Li Y, Teng D, Shan Z, Teng X, Guan H, Yu X, u. a. Antithyropoxidase and Antithyroglobulin Antibodies in a Five-Year Follow-Up Survey of Populations with Different Iodine Intakes. *JCEM*. 1. Mai 2008;93(5):1751–7.
17. Bensenor IM, Olmos RD, Lotufo PA. Hypothyroidism in the elderly: diagnosis and management. *Clin Interv Aging*. 2012;7:97–111.
18. McLachlan SM, Rapoport B. Autoimmune hypothyroidism: T cells caught in the act. *Nat. Med.* September 2004;10(9):895–6.
19. Becks GP, Burrow GN. Thyroid disease and pregnancy. *Med. Clin. North Am.* Januar 1991;75(1):121–50.
20. Wortsman J, Rosner W, Dufau ML. Abnormal testicular function in men with primary hypothyroidism. *Am. J. Med.* Februar 1987;82(2):207–12.
21. Huber G, Staub J-J, Meier C, Mitrache C, Guglielmetti M, Huber P, u. a. Prospective Study of the Spontaneous Course of Subclinical Hypothyroidism: Prognostic Value of Thyrotropin, Thyroid Reserve, and Thyroid Antibodies. *JCEM*. 1. Juli 2002;87(7):3221–6.
22. Krohn K, Führer D, Bayer Y, Eszlinger M, Brauer V, Neumann S, u. a. Molecular Pathogenesis of Euthyroid and Toxic Multinodular Goiter. *Endocrine Reviews*. 6. Januar 2005;26(4):504–24.
23. Nanba T, Watanabe M, Inoue N, Iwatani Y. Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto's disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Graves' disease. *Thyroid*. Mai 2009;19(5):495–501.
24. Vanderpump MP, Tunbridge WM, French JM, Appleton D, Bates D, Clark F, u. a. The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham Survey. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. Juli 1995;43(1):55–68.
25. Nielsen CH, Brix TH, Gardas A, Banga JP, Hegedüs L. Epitope recognition patterns of thyroid peroxidase autoantibodies in healthy individuals and patients with Hashimoto's thyroiditis\*. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. Oktober 2008;69(4):664–8.
26. Tomer Y. Anti-thyroglobulin autoantibodies in autoimmune thyroid diseases: cross-reactive or pathogenic? *Clin. Immunol. Immunopathol.* Januar 1997;82(1):3–11.
27. Brown RS. Autoimmune thyroid disease: unlocking a complex puzzle. *Curr. Opin. Pediatr.* August 2009;21(4):523–8.
28. Gaitonde DY, Rowley KD, Sweeney LB. Hypothyroidism: an update. *Am Fam Physician*. 1. August 2012;86(3):244–51.

29. Abduljabbar MA, Afifi AM. Congenital hypothyroidism. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2012;25(1-2):13–29.
30. Fisher DA. Thyroid system immaturities in very low birth weight premature infants. *Semin. Perinatol.* Dezember 2008;32(6):387–97.
31. Gardas A, Sohi MK, Sutton BJ, McGregor AM, Banga JP. Purification and crystallisation of the autoantigen thyroid peroxidase from human Graves' thyroid tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19. Mai 1997;234(2):366–70.
32. Ewins DL, Barnett PS, Ratanachaiyavong S, Sharrock C, Lanchbury J, McGregor AM, u. a. Antigen-specific T cell recognition of affinity-purified and recombinant thyroid peroxidase in autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol.* Oktober 1992;90(1):93–8.
33. Ruf J, Carayon P. Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 15. Januar 2006;445(2):269–77.
34. Brent GA. *Thyroid Function Testing.* Springer; 2010.
35. Böttcher Y, Eszlinger M, Tönjes A, Paschke R. The genetics of euthyroid familial goiter. *Trends Endocrinol. Metab.* September 2005;16(7):314–9.
36. Hermus AR, Huysmans DA. [Diagnosis and therapy of patients with euthyroid goiter]. *Ned Tijdschr Geneesk.* 19. August 2000;144(34):1623–7.
37. Homoki J, Teller WM. [Conservative strategies in treating thyroid diseases in children]. *Monatsschr Kinderheilkd.* März 1990;138(3):115–20.
38. Bürgi H. [Therapy of euthyroid goiter]. *Schweiz Med Wochenschr.* 17. Dezember 1988;118(50):1881–5.
39. Janeway CJ, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *The major histocompatibility complex and its functions.* Immunobiology. 5. Aufl. New York: Garland Science; 2001.
40. Parham P, Ohta T. Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science.* 5. April 1996;272(5258):67–74.
41. Andersen MH, Schrama D, Straten P, Becker JC. Cytotoxic T Cells. *Journal of Investigative Dermatology.* 1. Januar 2006;126(1):32–41.
42. Anderton SM, Wraith DC. Selection and fine-tuning of the autoimmune T-cell repertoire. *Nat. Rev. Immunol.* Juli 2002;2(7):487–98.
43. Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature.* 19. April 1974;248(450):701–2.
44. Brown MA. Progress in the genetics of ankylosing spondylitis. *Brief Funct Genomics.* September 2011;10(5):249–57.

45. Süsal C, Opelz G. Impact of HLA matching and HLA antibodies in organ transplantation: a collaborative transplant study view. *Methods Mol. Biol.* 2012;882:267–77.
46. Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R. New allele frequency database: <http://www.allelefreqencies.net>. *Tissue Antigens.* Mai 2003;61(5):403–7.
47. Moss PAH, Rosenberg WMC, Bell JI. The Human T Cell Receptor in Health and Disease. *Annual Review of Immunology.* 1992;10(1):71–96.
48. Quaratino S, Thorpe CJ, Travers PJ, Londei M. Similar antigenic surfaces, rather than sequence homology, dictate T-cell epitope molecular mimicry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24. Oktober 1995;92(22):10398–402.
49. Mason D. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Trends in Immunology.* 1. September 1998;19(9):395–404.
50. Kilgore NE, Ford ML, Margot CD, Jones DS, Reichardt P, Evavold BD. Defining the Parameters Necessary for T-Cell Recognition of Ligands That Vary in Potency. *Immunologic Research.* 2004;29(1-3):029–40.
51. Greenfield EA, Nguyen KA, Kuchroo VK. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit. Rev. Immunol.* 1998;18(5):389–418.
52. Dobrzanski MJ, Reome JB, Hollenbaugh JA, Dutton RW. Tc1 and Tc2 Effector Cell Therapy Elicit Long-Term Tumor Immunity by Contrasting Mechanisms That Result in Complementary Endogenous Type 1 Antitumor Responses. *J Immunol.* 2. Januar 2004;172(3):1380–90.
53. Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity.* Dezember 2000;13(6):829–40.
54. Walker LSK, Abbas AK. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat. Rev. Immunol.* Januar 2002;2(1):11–9.
55. Quaratino S, Feldmann M, Dayan CM, Acuto O, Londei M. Human self-reactive T cell clones expressing identical T cell receptor beta chains differ in their ability to recognize a cryptic self-epitope. *J. Exp. Med.* 1. Februar 1996;183(2):349–58.
56. Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity.* April 1997;6(4):411–7.
57. Walunas TL, Bluestone JA. CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo. *J. Immunol.* 15. April 1998;160(8):3855–60.
58. Lechler R, Chai JG, Marelli-Berg F, Lombardi G. T-cell anergy and peripheral T-cell tolerance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 29. Mai 2001;356(1409):625–37.
59. Young DA, Lowe LD, Booth SS, Whitters MJ, Nicholson L, Kuchroo VK, u. a. IL-4, IL-10, IL-13, and TGF-beta from an altered peptide ligand-specific Th2 cell

- clone down-regulate adoptive transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 1. April 2000;164(7):3563–72.
60. Bradley LM, Asensio VC, Schioetz LK, Harbertson J, Krahl T, Patstone G, u. a. Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. *J. Immunol.* 1. März 1999;162(5):2511–20.
61. Kurts C, Heath WR, Kosaka H, Miller JFAP, Carbone FR. The Peripheral Deletion of Autoreactive CD8+ T Cells Induced by Cross-presentation of Self-antigens Involves Signaling through CD95 (Fas, Apo-1). *J Exp Med.* 20. Juli 1998;188(2):415–20.
62. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science.* 10. März 1995;267(5203):1449–56.
63. Kurts C, Heath WR, Carbone FR, Allison J, Miller JF, Kosaka H. Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J. Exp. Med.* 1. September 1996;184(3):923–30.
64. Kurts C, Heath WR, Carbone FR, Kosaka H, Miller JF. Cross-presentation of self antigens to CD8+ T cells: the balance between tolerance and autoimmunity. *Novartis Found. Symp.* 1998;215:172–181; discussion 181–190.
65. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 14. Februar 2003;299(5609):1057–61.
66. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2004;22:531–62.
67. Schmidt A, Oberle N, Krammer PH. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol.* 2012;3:51.
68. Toda A, Piccirillo CA. Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol.* 9. Januar 2006;80(3):458–70.
69. De la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* September 2004;34(9):2480–8.
70. Boden E, Tang Q, Bour-Jordan H, Bluestone JA. The role of CD28 and CTLA4 in the function and homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Novartis Found. Symp.* 2003;252:55–63; discussion 63–66, 106–114.
71. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production. *J Exp Med.* 20. Juli 1998;188(2):287–96.
72. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, u. a. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science.* 10. Oktober 2008;322(5899):271–5.

73. Tran DQ, Glass DD, Uzel G, Darnell DA, Spalding C, Holland SM, u. a. Analysis of adhesion molecules, target cells and role of interleukin-2 in human FOXP3+ regulatory T cell suppressor function. *J Immunol.* 1. März 2009;182(5):2929–38.
74. Powell AM, Black MM. Epitope spreading: protection from pathogens, but propagation of autoimmunity? *Clin. Exp. Dermatol.* Juli 2001;26(5):427–33.
75. Miller SD, Vanderlugt CL, Begolka WS, Pao W, Yauch RL, Neville KL, u. a. Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat. Med.* Oktober 1997;3(10):1133–6.
76. Vanderlugt CL, Begolka WS, Neville KL, Katz-Levy Y, Howard LM, Eagar TN, u. a. The functional significance of epitope spreading and its regulation by co-stimulatory molecules. *Immunol. Rev.* August 1998;164:63–72.
77. McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat. Med.* März 2005;11(3):335–9.
78. Ercolini AM, Miller SD. The role of infections in autoimmune disease. *Clin Exp Immunol.* Januar 2009;155(1):1–15.
79. Gautam AM, Liblau R, Chelvanayagam G, Steinman L, Boston T. A viral peptide with limited homology to a self peptide can induce clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 1. Juli 1998;161(1):60–4.
80. Fujinami RS, Von Herrath MG, Christen U, Whitton JL. Molecular Mimicry, Bystander Activation, or Viral Persistence: Infections and Autoimmune Disease. *Clin Microbiol Rev.* Januar 2006;19(1):80–94.
81. Delogu LG, Deidda S, Delitala G, Manetti R. Infectious diseases and autoimmunity. *J Infect Dev Ctries.* Oktober 2011;5(10):679–87.
82. Kosor E, Gagro A, Drazenović V, Kuzman I, Jeren T, Rakusić S, u. a. [MHC tetramers: tracking specific immunity]. *Acta Med Croatica.* 2003;57(4):255–9.
83. Klenerman P, Cerundolo V, Dunbar PR. TRACKING T CELLS WITH TETRAMERS: NEW TALES FROM NEW TOOLS. *Nature Reviews Immunology.* April 2002;2(4):263–72.
84. Bogdanova N, Baleva M, Kremensky I, Markoff A. The annexin A5 protective shield model revisited: inherited carriage of the M2/ANXA5 haplotype in placenta as a predisposing factor for the development of obstetric antiphospholipid antibodies. *Lupus.* 1. Juni 2012;21(7):796–8.
85. Mariotti S, Caturegli P, Piccolo P, Barbesino G, Pinchera A. Antithyroid peroxidase autoantibodies in thyroid diseases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* September 1990;71(3):661–9.
86. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, u. a. Serum TSH, T4, and Thyroid Antibodies in the United States Population (1988

- to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *JCEM*. 1. Februar 2002;87(2):489–99.
87. Chen C-R, Hamidi S, Braley-Mullen H, Nagayama Y, Bresee C, Aliesky HA, u. a. Antibodies to Thyroid Peroxidase Arise Spontaneously with Age in NOD.H-2h4 Mice and Appear after Thyroglobulin Antibodies. *Endocrinology*. September 2010;151(9):4583–93.
88. Brazillet M, Batteux F, Abehsira-Amar O, Nicoletti F, Charreire J. Induction of experimental autoimmune thyroiditis by heat-denatured porcine thyroglobulin: a Tc1-mediated disease. *European Journal of Immunology*. 1. April 1999;29(4):1342–52.
89. Ng HP, Kung AWC. Induction of Autoimmune Thyroiditis and Hypothyroidism by Immunization of Immunoactive T Cell Epitope of Thyroid Peroxidase. *Endocrinology*. 6. Januar 2006;147(6):3085–92.
90. McLachlan SM, Rapoport B. Evidence for a potential common T-cell epitope between human thyroid peroxidase and human thyroglobulin with implications for the pathogenesis of autoimmune thyroid disease. *Autoimmunity*. 1989;5(1-2):101–6.
91. Wong CP, Stevens R, Long B, Li L, Wang Y, Wallet MA, u. a. Identical  $\beta$  Cell-Specific CD8+ T Cell Clonotypes Typically Reside in Both Peripheral Blood Lymphocyte and Pancreatic Islets. *J Immunol*. 1. Februar 2007;178(3):1388–95.
92. Rapoport B, McLachlan SM. Thyroid autoimmunity. *J Clin Invest*. 1. November 2001;108(9):1253–9.
93. Mariotti S, Sansoni P, Barbesino G, Caturegli P, Monti D, Cossarizza A, u. a. Thyroid and other organ-specific autoantibodies in healthy centenarians. *Lancet*. 20. Juni 1992;339(8808):1506–8.
94. Latrofa F, Ricci D, Grasso L, Vitti P, Masserini L, Basolo F, u. a. Characterization of Thyroglobulin Epitopes in Patients with Autoimmune and Non-Autoimmune Thyroid Diseases Using Recombinant Human Monoclonal Thyroglobulin Autoantibodies. *JCEM*. 2. Januar 2008;93(2):591–6.
95. Rebuffat SA, Nguyen B, Robert B, Castex F, Peraldi-Roux S. Antithyroperoxidase Antibody-Dependent Cytotoxicity in Autoimmune Thyroid Disease. *JCEM*. 3. Januar 2008;93(3):929–34.
96. Blanchin S, Estienne V, Durand-Gorde J-M, Carayon P, Ruf J. Complement Activation by Direct C4 Binding to Thyroperoxidase in Hashimoto's Thyroiditis. *Endocrinology*. 12. Januar 2003;144(12):5422–9.
97. Mazziotti G, Sorvillo F, Naclerio C, Farzati A, Cioffi M, Perna R, u. a. Type-1 response in peripheral CD4+ and CD8+ T cells from patients with Hashimoto's thyroiditis. *Eur J Endocrinol*. 1. April 2003;148(4):383–8.

98. Quaratino S, Duddy LP, Londei M. Fully competent dendritic cells as inducers of T cell anergy in autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26. September 2000;97(20):10911–6.
99. Badami E, Maiuri L, Quaratino S. High incidence of spontaneous autoimmune thyroiditis in immunocompetent self-reactive human T cell receptor transgenic mice. *J. Autoimmun.* März 2005;24(2):85–91.



## 8 ANHANG

### 8.1 Patienteninformation und Einverständniserklärung für HT-Patienten

Patienteninformation und  
Patienteneinverständniserklärung  
zum Forschungsprojekt mit dem Thema  
„Rolle von autoreaktiven T-Zellen bei der  
Autoimmunthyreoiditis“

Sehr geehrter Patient,  
sehr geehrte Patientin,

mit dieser Information möchten wir Sie um Ihre Mithilfe bitten. Bei Ihnen wurde die Diagnose einer Autoimmunthyreoiditis gestellt. Es handelt sich dabei um eine Immunerkrankung, bei der es zu einer chronischen Entzündung der Schilddrüse kommt, wobei die Zerstörung des Schilddrüsengewebes unter anderem auf bestimmte Immunzellen (T-Zellen) zurückzuführen ist. Hierbei handelt es sich um weiße Blutzellen, die normalerweise der Immunabwehr dienen, sich in diesem Fall aber auch gegen körpereigenes Gewebe richten.

Ziel eines aktuell in unserer Klinik laufenden Forschungsprojektes ist es, die Rolle der autoreaktiven T-Zellen genauer zu untersuchen. Im Detail bedeutet dies, in Ihrem Blut und ggf. in der Schilddrüse T-Zellen nachzuweisen, die gegen Schilddrüsenoberflächenmoleküle (Antigene) gerichtet sind. Hierzu werden verschiedene Laboruntersuchungen (HLA-Bestimmung, Tetramer-Analysen etc.) mit dem Blut durchgeführt.

Sofern Sie einverstanden sind, werden wir von Ihnen ein Röhrchen venöses Blut (circa 8 ml) entnehmen. Zu den Risiken der Blutabnahme gehört das Entstehen blauer Flecken im Bereich der Einstichstelle. Es besteht das sehr geringe Risiko einer lokalen oder allgemeinen Infektion. In extrem seltenen Fällen kann es zu einer Verletzung eines





## 8.2 Patienteninformation und Einverständniserklärung für Struma-Patienten

Patienteninformation und  
Patienteneinverständniserklärung  
zum Forschungsprojekt mit dem Thema  
„Rolle von autoreaktiven T-Zellen bei der  
Autoimmunthyreoiditis“

Sehr geehrter Patient,  
sehr geehrte Patientin,

mit dieser Information möchten wir Sie um Ihre Mithilfe bitten. Bei Ihnen wurde die Diagnose einer Struma, also einer Vergrößerung der Schilddrüse, unabhängig von ihrer Funktionslage, gestellt.

Ziel eines aktuell in unserer Klinik laufenden Forschungsprojektes ist es, die Rolle von autoreaktiven T-Zellen bei einer Autoimmunerkrankung der Schilddrüse genauer zu untersuchen. Im Detail bedeutet dies, nachzuweisen, dass in Ihrem Blut KEINE Immunzellen (T-Zellen) existieren, die gegen eigene Schilddrüsenoberflächenmoleküle (Antigene) gerichtet sind. Hierzu werden verschiedene Laboranalysen (HLA-Bestimmung, Tetramer-Analysen etc.) mit dem Blut durchgeführt und mit den Ergebnissen von Patienten mit einer Autoimmunthyreoiditis verglichen.

Sofern Sie einverstanden sind, werden wir von Ihnen ein Röhrchen venöses Blut (circa 8 ml) entnehmen. Zu den Risiken der Blutabnahme gehört das Entstehen blauer Flecken im Bereich der Einstichstelle. Es besteht das sehr geringe Risiko einer lokalen oder allgemeinen Infektion. In extrem seltenen Fällen kann es zu einer Verletzung eines Hautnervs, evtl. sogar mit chronischem Verlauf, kommen. Das entnommene Blut wird nachfolgend in unser Forschungslabor überführt, um dort die o.g. Analysen durchzuführen. Falls bei Ihnen zusätzlich eine Schilddrüsenpunktion im Rahmen der Routineuntersuchung notwendig werden würde, so würden Reste des Schilddrüsengewebes (die normalerweise in der Punktionsnadel verbleiben) ebenfalls

für die Laboruntersuchungen verwendet werden. Eine zusätzliche Schilddrüsenpunktion ist nicht notwendig.

Die in Zusammenhang mit den Untersuchungen erhobenen Daten werden nur von wissenschaftlichen Mitarbeitern eingesehen, die sämtlich der Schweigepflicht unterliegen. Personenbezogene Informationen werden absolut vertraulich behandelt und unterliegen den allgemeinen Bestimmungen des Datenschutzes. Weitere Fragen werden sehr gern von uns beantwortet.

Einwilligungserklärung:

Über Inhalt, Ablauf und Tragweite der geplanten Untersuchung wurde ich aufgeklärt. Die Patienteninformation habe ich gelesen, verstanden und alle meine Fragen klären können.

Ich bin damit einverstanden, dass ein Teil des bei mir entnommenen Blutes für wissenschaftliche Untersuchungen genutzt wird.

\_\_\_\_\_  
Name des Patienten                      Ort, Datum                      Unterschrift

\_\_\_\_\_  
Name des Arztes                      Ort, Datum                      Unterschrift

## Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schott, danke ich ganz herzlich, dass er mich in sein Forschungsteam aufgenommen hat und die Verwirklichung des Hashimoto-Projektes ermöglichte.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens bin ich Univ.-Prof. Dr. med. Hans-Wilhelm Müller sehr dankbar.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. rer. nat. Claudia Papewalis, die mich während der zwei Jahre im Labor betreut hat.

In besonderer Weise danke ich Frau Dr. rer. nat. Margret Ehlers für ihre fachkompetente Hilfe bei all meinen Fragen und das Korrekturlesen meiner Arbeit. Frau Dr. med. Annette Thiel danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung und grafischen Aufarbeitung meiner Daten mittels Prism, sowie die Umsetzung der letzten Zytotoxizitätstests. Beiden danke ich für die Zusammenarbeit am gemeinsamen Paper, das im April 2012 im „Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism“ publiziert wurde.

Allen Ärzten der endokrinologischen Ambulanz, besonders Dr. med. Christian Bernecker, danke ich für die einjährige Probenakquirierung von Blut und Schilddrüsenpunktaten, sowie die Durchführung der dazugehörigen Patientenaufklärungen.

Für die angenehme konstruktive Arbeitsatmosphäre danke ich allen Mitarbeitern und Doktoranden des Laborteams. Für ihre hilfreichen Tipps zu Materialien und Zellkultur bin ich Frau Roswitha Charco sehr dankbar.

Herrn Pröpper aus dem Sekretariat danke ich für seine Hilfe beim Heraussuchen von Patientenbriefen.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, meinem Großvater, meinem Freund und meinen besten Freunden für ihre liebevolle Unterstützung, den stetigen Rückhalt und ein immer offenes Ohr.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Dominika Porwol