

Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Michael Roden  
Funktionsbereich Spezielle Endokrinologie  
Ärztlicher Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schott

Untersuchung verschiedener microRNAs aus PBMCs,  
CD4+ und CD8+ T-Zellen im peripheren Blut bei  
Patienten mit Morbus Basedow und Hashimoto-Thyreoiditis

Dissertation

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

vorgelegt von  
Florian David Halim  
2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Matthias Schott

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Frederik Lars Giesel

Meinen Eltern und Aida in Liebe  
und Dankbarkeit gewidmet

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht:

Christian Bernecker, **Florian Halim**, Luisa Lenz, Matthias Haase, Thi Bang Tam Nguyen, Margret Ehlers, Stefan Vordenbaeumen, Matthias Schott. 2014. microRNA expressions in CD4+ and CD8+ T-cell subsets in autoimmune thyroid diseases. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 122, 107–112.

## Zusammenfassung

Der Morbus Basedow (MB) und der Hashimoto-Thyreoiditis (HT) sind die häufigsten Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse (AIT). *MicroRNAs* (miRNAs) steuern entscheidend die Genexpression und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Immunreaktion. Das Ziel der vorliegenden Studie war der Nachweis signifikanter Variationen von wichtigen immunregulatorischen miRNAs in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) und in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen von AIT-Patienten. Hierzu wurden ausgewählte miRNAs durch eine semiquantitative SYBR Green PCR aus PBMCs und gereinigten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen von 59 Patienten mit MB, HT und der Kontrollgruppe (KG) amplifiziert. Sowohl MB als auch HT zeigten signifikant verringerte miRNA 200a<sub>1</sub> und miRNA 200a<sub>2</sub><sup>\*</sup> in CD4<sup>+</sup> T-Zellen (mittlere relative Expression 12,57 in HT vs. 19,40 in KG,  $p = 0.0002$ ; 12,10 in MB vs. 19,40 in KG,  $p = 0.0002$ ) und in CD8<sup>+</sup> T-Zellen (13,13 in HT vs. 18,12 in KG,  $p = 0.02$ ; 11,66 in MB vs. 18,12 in KG,  $p = 0,0002$ ). Darüber hinaus zeigten MB und HT eine signifikant verringerte miRNA 155<sub>2</sub> und miRNA 155<sup>\*</sup><sub>1</sub> in HT in CD8<sup>+</sup> T-Zellen (10,69 in HT vs. 11,30 in KG,  $p = 0,01$ ; 10,40 in MB vs. 11,30 in KG,  $p = 0,005$ ). Die vorliegende Studie bestätigt signifikante Variationen von miRNA200a und miRNA155 bei Patienten mit MB und HT *in vivo* in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die gesammelten Daten können zum besseren Verständnis der Genregulationen in den Zellen, welche diese Autoimmunprozesse verursachen, beitragen und erweitern unser sehr begrenztes Wissen über miRNAs bei Schilddrüsenerkrankungen.

## **Abstract**

Graves' disease (GD) and Hashimoto's thyroiditis (HT) are the most common autoimmune thyroid diseases (AITD). MicroRNAs (miRNAs) critically control gene-expression and play an important role in regulating the immune response. The aim of this study was to prove significant variations of key immunoregulatory miRNAs in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and in CD4+ and CD8+ T-cells of AITD patients. Selected miRNAs were amplified by a semiquantitative SYBR Green PCR from PBMCs and purified CD4+ and CD8+ T-cells of 59 patients with GD, HT, and control group (CG). Both GD and HT showed significantly decreased miRNA 200a<sub>1</sub> and miRNA 200a2\* in CD4+ T-cells (mean relative expression 12,57 in HT vs. 19.40 in CG,  $p = 0.0002$ ; 12,10 in GD vs. 19.40 in CG,  $p = 0.0002$ ) and in CD8+ T-cells (13.13 in HT vs. 18,12 in CG,  $p = 0.02$ ; 11.66 in GD vs. 18.12 in CG,  $p = 0.0002$ ). Moreover, GD and HT showed significantly decreased miRNA 155<sub>2</sub> and miRNA 155\*<sub>1</sub> in HT in CD8+ T-cells (10.69 in HT vs. 11.30 in CG,  $p = 0.01$ ; 10.40 in GD vs. 11.30 in CG,  $p = 0.005$ ). This study confirms significant variations of miRNA200a and miRNA155 in patients suffering from GD and HT *in vivo* in CD4+ and CD8+ T-cells. These data may help to better understand the gene regulations in the causative cells causing these autoimmune processes. They extend our very limited knowledge concerning miRNAs in thyroid diseases.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AIT</b>	Autoimmunthyreoiditis
<b>ANA-Titer</b>	Autoantikörper-Titer
<b>APZ</b>	Antigenpräsentierende Zelle
<b>C. elegans</b>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<b>CPT</b>	<i>Cell Preparation Tube</i>
<b>CRP</b>	C-Reaktives Protein
<b>Ct</b>	<i>comparative cycle threshold</i>
<b>CTLA-4</b>	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
<b>GWA</b>	Genomweite Assoziationsstudien
<b>HT</b>	Hashimoto-Thyreoiditis
<b>HLA</b>	Humane Leukozytenantigene
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>LDL</b>	<i>Low Density Lipoprotein</i>
<b>MACS</b>	<i>magnetic activated cell sorting</i>
<b>MB</b>	Morbus Basedow
<b>MHC</b>	<i>major histocompatibility complex</i>
<b>MO</b>	Monozyt
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>
<b>miRNA</b>	<i>microRNA</i>
<b>NK</b>	Natürliche Killerzelle
<b>NKT</b>	Natürliche Killer-T-Zelle

<b>NOD</b>	<i>non obese diabetic</i>
<b>nt</b>	Nukleotiden
<b>PCR</b>	Polymerase Kettenreaktion
<b>PBMC</b>	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
<b>PK</b>	Proteinase K
<b>PRC</b>	<i>PAXgene</i> RNA-Spinsäule
<b>PSC</b>	<i>PAXgene</i> Homogenisier-Spinsäule
<b>PTPN22</b>	<i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22</i>
<b>PTU</b>	Propylthiouracil
<b>qRT-PCR</b>	quantitative <i>Real time</i> Polymerase-Kettenreaktion
<b>rpm</b>	<i>revolutions per minute</i>
<b>RT-Reaktion</b>	Reverse Transkriptase-Reaktion
<b>SNP</b>	Einzelnukleotid-Polymorphismus
<b>TCR</b>	T-Zell-Rezeptor
<b>Tg</b>	Thyreoglobulin
<b>TPO</b>	Thyreoperoxidase
<b>TRAK</b>	Thyreotropin-Rezeptor-Autoantikörper
<b>TSH</b>	Thyreoida-stimulierendes Hormon

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Hashimoto-Thyreoiditis .....	1
1.1.1 Ätiologie.....	1
1.1.2 Pathogenese .....	3
1.1.3 Diagnosestellung .....	3
1.1.4 Therapie .....	5
1.2 Morbus Basedow .....	5
1.2.1 Ätiologie.....	5
1.2.2 Pathogenese .....	6
1.2.3 Diagnosestellung .....	6
1.2.4 Therapie .....	7
1.3 Das Immunsystem und zytotoxische T-Zellen.....	8
1.4 MicroRNA.....	9
1.5 Die Rolle von miRNAs bei Autoimmunerkrankungen .....	11
1.6 Ziel der Studie .....	12
2. Material und Methoden .....	13
2.1 Ethikvotum .....	13
2.2 Patienten und Kontrollen.....	13
2.2.1 Kriterien HT-Gruppe .....	13
2.2.2 Kriterien MB-Gruppe.....	14
2.2.3 Kontrollgruppe .....	14
2.2.4 Ausschlusskriterien.....	15
2.2.5 Blutwerte .....	15
2.2.6 Blutentnahme .....	15
2.3 Material .....	15
2.4 Methoden .....	19
2.4.1 Weiterbehandlung der Blutproben.....	19
2.4.2 Isolierung der peripheren mononukleären Zellen .....	20
2.4.3 CD4+ und CD8+ Isolation aus PBMCs.....	21
2.4.4 RNA-Isolation .....	24
2.4.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA .....	28

2.4.6	cDNA-Synthese .....	28
2.4.7	Quantitative Real time Polymerase-Kettenreaktion .....	30
2.5	Statistik .....	33
3.	Ergebnisse.....	34
4.	Diskussion .....	44
5.	Schlussfolgerung.....	48
6.	Literatur- und Quellenverzeichnis .....	49

## **1. Einleitung**

Bei einer Autoimmunerkrankung produziert der Körper Zellen oder Antikörper, die Gewebe und/oder verschiedene Organe angreifen, wobei mehr als 30% aller organspezifischen Autoimmunkrankheiten die Schilddrüse betreffen (Quarantino et al., 2004). Zu den häufigsten Autoimmunthyreoiditen (AIT) gehören der Hashimoto-Thyreoiditis und der Morbus Basedow (Bliddal et al., 2017). Sie weisen eine Autoantikörperbildung gegen schilddrüsenspezifische Strukturen auf (Hadj-Kacem et al., 2009), die die Hauptziele Thyreoglobulin (Tg), Thyreoperoxidase (TPO) und den TSH-Rezeptor (Thyreidea-stimulierendes Hormon) haben.

### **1.1 Hashimoto-Thyreoiditis**

Der Hashimoto-Thyreoiditis (HT), welcher 1912 erstmalig vom japanischen Arzt Dr. Hakaru Hashimoto beschrieben wurde, wird auch (chronisch) lymphozytäre Thyreoiditis genannt (Hashimoto, 1912). Er stellt die häufigste Ursache für eine Hypothyreose in allen Altersgruppen dar (Lorini et al., 2003). Die Prävalenz in Deutschland liegt bei 5-10%, bevorzugt betroffen sind Frauen ( $w : m = 9 : 1$ ) und der Altersgipfel liegt zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr (Herold, 2022). Typisch für HT ist die Autoantikörperbildung gegen Tg und TPO sowie eine T-Zell-vermittelte Schilddrüsendestruktion mit Funktionsverlust (Rose et al., 2002).

#### **1.1.1 Ätiologie**

Bei der HT handelt es sich ätiologisch um eine Interaktion zwischen triggernden Umwelteinflüssen und genetischen Faktoren (Dong and Fu, 2014). Der HT tritt gehäuft zusammen mit anderen Autoimmunerkrankungen auf, insbesondere Diabetes mellitus Typ 1, aber auch andere, wie Morbus Addison, Zölliakie, Alopezie, Vitiligo und im Rahmen eines Polyglandulären Syndroms Typ 2 und 3 (Boelaert et al., 2010; Fink and Hintze, 2010; Lorini et al., 2003). Als triggernde Umwelteinflüsse gelten eine hohe Jodzufuhr (unter anderem durch jodhaltige Medikamente, hochdosierte Nahrungsergänzungsmittel), Stress und psychische Belastung sowie Infektionen, wie Hepatitis C, Coxsackie Virus, Epstein-Barr-Virus und Yersinia enterocolitica (Hadj-Kacem et al., 2009; Lehmann et al., 2008;

Mori and Yoshida, 2010). Es konnte in mehreren Studien eine Assoziation mit einer akuten Parvovirus B19-Infektion, welche sowohl im Blut als auch in der Schilddrüse nachweisbar war, festgestellt werden (Adamson et al., 2011; Lehmann et al., 2008; Wang et al., 2010). Die Infektion wird möglicherweise durch die Genexpression des proinflammatorischen Zytokin IL-6 induziert (Moffatt et al., 1996).

Klinische und epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass eine übermäßige Aufnahme von Jod einen Umweltfaktor für die Entwicklung von HT darstellt (Rose et al., 2002). Eine große Follow-up Studie in China konnte nachweisen, dass Menschen aus Regionen mit einer Jodübersorgung häufiger Autoantikörper gegen Tg und TPO bilden, was mit einem höheren Risiko für eine Hypothyreose bei HT-Patienten einherging (Li et al., 2008). Auch im Tiermodell konnte man anhand von NOD.H2<sup>h4</sup>-Mäusen (*non obese diabetic*) zeigen, dass die Prävalenz und die Schwere der AITs signifikant und dosisabhängig bei Mäusen anstiegen, die iodidhaltiges Wasser erhielten (Rose et al., 2002).

Der HT konnte als genetische Disposition mit den *Human Leucocyte Antigen*-Molekülen HLA-DR3, -DR4 und -DR5 assoziiert werden (Hadj-Kacem et al., 2009). Einen möglichen Erklärungsansatz hierfür stellen die Selbst-Peptide dar, die diverse Bindungsaffinitäten für unterschiedliche HLA-Moleküle besitzen (Rose et al., 2002). Ätiologisch nehmen auch andere schilddrüsenspezifische oder immunmodulatorische Gene, wie Thyreoglobulin-Gene, PTPN22 (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*) und CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) eine wichtige Rolle ein (Jacobson and Tomer, 2007). Allerdings folgt die Vererbung nicht den Mendelschen Vererbungsregeln (Paknys et al., 2009). „Der“ auslösende Prozess des HT ist jedoch noch nicht vollständig geklärt (Duntas, 2008; Hadj-Kacem et al., 2009; Jørgensen et al., 2010; Tomer and Huber, 2009).

Als Sonderform kann eine Thyreoiditis auch als Nebenwirkung einer Immuncheckpoint-Inhibitor-Therapie entstehen, entweder als Reaktivierung einer bestehenden latenten AIT (Gutzmer et al., 2017; Johnson et al., 2016; Menzies et al., 2017) oder ohne vorherige Erkrankung. Die Immuncheckpoint-Inhibitor-Therapie löst bei 86-96% der Patienten autoimmune Nebenwirkungen aus, welche sich in allen Organsystemen manifestieren (Heinzerling et al., 2019). Der Anteil an Endokrinopathien, darunter auch Thyreoiditis, liegt bei 12-34% (Wolchok et al.,

2017). Die autoimmunen Nebenwirkungen unterscheiden sich von den korrespondierenden spontan auftretenden Autoimmunerkrankungen in der Serologie, Immunologie und Histologie (Heinzerling et al., 2019). Bei dieser Form der Thyreoiditis kommt es meist zu einer vorübergehenden Hyperthyreose mit anschließender Hypothyreose (Lee et al., 2017; Spain et al., 2016).

### **1.1.2 Pathogenese**

Pathognomonisch für HT ist eine Infiltration der Schilddrüse durch autoreaktive T-Zellen, CD8+ zytotoxische T-Zellen, CD4+ T-Helferzellen und B-Zellen, welche für die Produktion von Anti-TPO und Anti-Tg Antikörper verantwortlich sind und gemeinsam zu einer inflammatorischen Destruktion der Thyreozyten führt (Hollowell et al., 2002; Pearce et al., 2003). Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits aufzeigen, dass zytotoxische CD8+ T-Zellen von HT-Patienten TPO und Tg-Antikörper erkennen (Ehlers et al., 2012) und in Kooperation mit natürlichen Killerzellen beim Erkrankungsprozess involviert sind (Ng and Kung, 2006). Regulierende CD4+ T-Zellen scheinen eine wichtige Rolle in der Moderation dieser autoimmunologischen Prozesse bei der HT zu spielen (Hidaka et al., 1992; Itoh et al., 1999). Zu Krankheitsbeginn bleibt der HT klinisch meist unbemerkt, wobei es vereinzelt, anfangs zu einer schmerzfreien diffusen Struma kommt. Im Krankheitsverlauf kommt es im Spätstadium zu einer Atrophie und Fibrose der Schilddrüse und zu einer Hypothyreose (Hadj-Kacem et al., 2009; Herold, 2022).

### **1.1.3 Diagnosestellung**

Wie zuvor beschrieben, bleibt der HT zu Krankheitsbeginn häufig unbemerkt, so dass die Diagnosestellung teilweise erst im Stadium der Hypothyreose erfolgt (Hadj-Kacem et al., 2009). Der Großteil der Patienten bleibt jedoch euthyreot (Lorini et al., 2003). Im Verlauf des HT kann es auch aufgrund der Parenchymdestruktion und der damit verbundenen Freisetzung präformierter Schilddrüsenhormone, vorübergehend zu einer leichten Hyperthyreose kommen (Lorini et al., 2003). Die Schwere des HT schwankt stark: einige Patienten bleiben lebenslang euthyreot, bei anderen erholt sich die Schilddrüsenfunktion im Verlauf und wieder andere entwickeln frühzeitig eine Hypothyreose (Lorini et al., 2003;

Nanba et al., 2009). Depressive Stimmung, Antriebsschwäche, Kälteempfindlichkeit, Obstipation sowie kalte, trockene Haut stellen typische klinische Symptome der manifesten Schilddrüsenunterfunktion dar (Bensenor et al., 2012). In einer Studie in den USA kam es außerdem bei 70% der hypothyreoten HT-Patienten zu einer Gewichtssteigerung (McLachlan and Rapoport, 2004). Darüber hinaus wurde eine reduzierte Fertilität beider Geschlechtsgruppen mit Hypothyreose bei AITs festgestellt (Becks and Burrow, 1991; Wortsman et al., 1987). Einzelne Studien vermuten zudem, dass eine latente Hypothyreose zu relevanten Langzeitfolgen führen kann. Hierbei wurden ein erhöhtes LDL-Cholesterin (*Low Density Lipoprotein*), ein erhöhtes Risiko für koronare Herzerkrankungen, eine erniedrigte Knochendichte und ein negativer Einfluss auf die Hämostase genannt (Huber et al., 2002; Krohn et al., 2005). Für eine Diagnostik bedarf es dem Nachweis von Autoantikörpern gegen TPO und Tg im peripheren venösen Blut des Patienten. Ein Hauptmerkmal der HT stellen IgG-Autoantikörper (Immunglobulin G) dar, da 70% der Patienten Anti-Tg-Antikörper aufweisen und 95% der HT-Patienten Anti-TPO positiv sind (Herold, 2022).

Die Bildung von Autoantikörpern scheint eine Geschlechterpräferenz aufzuweisen, da eine positive Korrelation der Autoantikörper mit dem weiblichen Geschlecht und zunehmenden Alter beschrieben wurde (Li et al., 2008). Auch die *Follow-up*-Studie des „*Whickham survey*“ zeigt ähnliche Ergebnisse im Zusammenhang mit dem Geschlecht auf (Vanderpump et al., 1995). Welche Rolle die Autoantikörper bei der Pathogenese des HT spielen, wurde bisweilen kontrovers diskutiert. Laut aktuellem Stand der Wissenschaft, ist den Autoantikörpern keine Bedeutung bei der Krankheitsinitiation zuzuschreiben (Nielsen et al., 2008; Tomer, 1997). Hauptsächlich wird der HT als T-Zell-vermittelte Erkrankung angesehen (Brown, 2009; McLachlan and Rapoport, 2004).

Für die diagnostische Abklärung wird zudem eine Sonografie der Schilddrüse benötigt, welche sich meist echoarm darstellt (Fink and Hintze, 2010). In der Histologie zeigt sich bei der HT eine Infiltration mit B-Zellen, T-Zellen, follikulären und interdigitierenden dendritischen Zellen sowie ein progredienter Ersatz der Schilddrüsenfollikel (Armengol et al., 2001).

### **1.1.4 Therapie**

Im Falle einer Hypothyreose ist eine lebenslange L-Thyroxin Substitution die Therapie der Wahl, wobei es unerlässlich ist, alle 6-12 Monate das TSH und das freie T4 des Patienten zu kontrollieren, um die Hormondosis gegebenenfalls anzupassen (Lorini et al., 2003). Der Krankheitsfortgang lässt sich kurativ nicht beeinflussen, jedoch ist die Lebenserwartung mit einer optimalen Therapie normal (Gaitonde et al., 2012).

## **1.2 Morbus Basedow**

Der Morbus Basedow (MB) wurde von Carl Adolf von Basedow in Merseburg im Jahr 1840 (Basedow, 1840) beschrieben und später nach ihm benannt. Im englischsprachigen Raum wird er nach seinem Erstbeschreiber Robert James Graves als *Graves' disease* bezeichnet (Graves, 1835). MB ist nach HT die zweithäufigste autoimmune Schilddrüsenerkrankung und tritt häufig in Kombination mit Tachykardie und endokriner Ophthalmopathie (sogenannte Merseburger Trias) auf (Basedow, 1840). MB tritt mit einer Inzidenz von ca. 0,1–2% auf (Perros et al., 2017) und kann sich sowohl thyreoidal als auch extrathyreoidal manifestieren. Das verbindende Merkmal der thyreoidalen und extrathyreoidalen Manifestationen ist die lymphozytäre Infiltration der betroffenen Gewebe. Als extrathyreoidale Manifestation zeigen sich vornehmlich die endokrine Orbitopathie, das prätibiale Myxödem sowie die Akropathie (Hotze et al., 2003). MB tritt in etwa fünfmal häufiger bei Frauen als bei Männern auf, bei Rauchern und bei Patienten, die bereits eine positive Familienanamnese oder andere Autoimmunerkrankungen haben (Manji et al., 2006). Die Krankheit kann in jeder Altersgruppe auftreten, aber entsteht in zwei Drittel der Fälle nach dem 35. Lebensjahr (Herold, 2022).

### **1.2.1 Ätiologie**

Die Ätiologie des MB liegt in der Herstellung von speziellen IgG Antikörpern, die an den TSH-Rezeptoren auf der basalen Zellmembran der Schilddrüsenzelle binden (DeGroot and Quintans, 1989). Nach aktuellem Stand der Wissenschaft, sind die Epitope der stimulierenden und blockierenden Antikörper am ehesten in der

N-terminalen extrazellulären Domäne des TSH-Rezeptors lokalisiert (Kleinau et al., 2011). Durch stimulierende Antikörper werden die TSH-Rezeptoren aktiviert und es kommt zum Schilddrüsenzellenwachstum sowie gegebenenfalls zu einer Struma diffusa und dem Anstieg der Schilddrüsenhormone T3 und T4 (vorrangig T3) (Brent, 2008).

### **1.2.2 Pathogenese**

Die genaue Pathogenese der Erkrankung ist bis heute unbekannt. Jedoch wird davon ausgegangen, dass das Zusammenwirken einer genetischen Disposition und eines unbekanntes Triggers (vermutlich Infektion) zur Bildung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern (TSH-R-AK = TRAK) kommt und diese die Schilddrüse stimulieren (Herold, 2022). Ein weiterer möglicher Faktor könnte psychosozialer Stress sein. Für eine genetische Ursache des MB spricht darüber hinaus das gehäufte Auftreten von bestimmten Humanen Leukozytenantigenen (HLA), zum Beispiel HLA-DQA1\*0501 und HLA-DR3 (Schott and Scherbaum, 2006) sowie HLA-B1 (Hotze et al., 2003). Anhand von speziellen Bluttests lassen sich diese Antigene untersuchen, welche vorrangig für wissenschaftliche Zwecke herangezogen werden.

### **1.2.3 Diagnosestellung**

Bei Erstdiagnose des MB liegt häufig eine manifeste Hyperthyreose vor. Wie in den europäischen Leitlinien von 2018 bestätigt, ist für die Diagnosestellung des MB die Bestimmung der sehr spezifischen TRAK essenziell, für deren Detektion im klinischen Alltag meist kompetitive Assays der 2. und 3. Generation mit einer Festphasentechnologie verwendet werden (Frank et al., 2015; Kahaly et al., 2018). Die Sensitivitäten bzw. Spezifitäten der meisten Assays liegen bei ca. 98-99%, können jedoch keine Aussage über die Funktion der TRAK tätigen (Schott et al., 2000). Aktuelle Leitlinien betonen jedoch die Unterscheidung zwischen blockierenden und stimulierenden Antikörpern mit Bioassays (Frank et al., 2015; Kahaly et al., 2018), welche primär unter wissenschaftlichen Aspekten von Interesse sind. Typischerweise zeigt sich sonographisch beim MB ein vergrößertes Schilddrüsenvolumen, ein diffus echoarmes und inhomogenes Parenchym und

eine eindeutige Hypervaskularisation (Allelein and Schott, 2019). Im Allgemeinen ist zur Diagnoseerstellung eine Szintigrafie nicht erforderlich. Typisch für den MB ist eine erhöhte globale *Tracer*-Aufnahme mit homogener, volumenproportionaler Verteilung (Allelein and Schott, 2019).

Die Symptome des MB sind vielfältig, treten in der Regel plötzlich auf und sind vornehmlich gekennzeichnet durch die Beschwerden der Hyperthyreose. Symptome einer immunogenen Form der Hyperthyreose sind: Gewichtsverlust, Sinustachykardie, Diarrhoe, Wärmeintoleranz, vermehrtes Schwitzen, innere Unruhe, Nervosität, Schlafstörungen und feinschlägiger Tremor sowie in ca. 60% der Fälle eine endokrine Orbitopathie durch die lymphozytäre Infiltration der Augenmuskeln, des Binde- und Fettgewebes des Retrobulbärtraums (Hotze et al., 2003). Dabei ist das Leitsymptom der endokrinen Orbitopathie der Exophthalmus (Hotze et al., 2003). Weitere Symptome der endokrinen Orbitopathie sind: Retrobulbäres Druckgefühl, Fremdkörpergefühl, Lichtscheu, Lidödeme, vermehrter Tränenfluss, Chemosis, Konjunktivitis, Lidretraktion (sichtbarer Sklerastreifen), Doppelbilder, Hornhautulzerationen und Visusverlust (Hotze et al., 2003).

#### **1.2.4 Therapie**

Die Therapie für eine manifeste Hyperthyreose bei MB sieht eine medikamentöse Behandlung mit Thyreostatika vom Thioamid-Typ (Thiamazol und Carbimazol) oder Propylthiouracil (PTU) vor, welche die Schilddrüsenhormonsynthese dosisabhängig hemmen (Allelein and Schott, 2019). Die Thyreostatika-Dosis wird entsprechend der Ausprägung der Hyperthyreose und der Jodversorgung des Patienten ausgerichtet. Die Remissionsrate bei der antithyreoidalen Therapie beträgt ca. 50–60% (Herold, 2022) und tritt meist in den ersten 12 bis 18 Monaten auf (Allelein and Schott, 2019). Im weiteren Krankheitsverlauf kann die Thyreostatika-Dosis entsprechend den peripheren Schilddrüsenhormonen angepasst und meist fortlaufend reduziert werden (Allelein and Schott, 2019). Ein Auslassversuch erfolgt, sobald eine stabile, euthyreote Schilddrüsenfunktion mit niedriger Thyreostatika-Dosis vorliegt. Im Falle eines Rezidivs oder fehlender Remission innerhalb von 12 bis 18 Monaten, ist eine Radiojodtherapie oder Thyreoidektomie als definitive Therapie indiziert (Allelein and Schott, 2019).

### 1.3 Das Immunsystem und zytotoxische T-Zellen

Das Immunsystem stellt ein komplexes System aus humoralen und zellulären sowie spezifischen und angeborenen Abwehrmechanismen von Pathogenen dar (Andersen et al., 2006). Die unspezifische Abwehr von Pathogenen erfolgt zügig durch die angeborene Immunität, wohingegen die spezifische, etwas verzögert, durch die erworbene Immunabwehr erfolgt (Andersen et al., 2006). Die beiden Abwehrmechanismen beeinflussen sich gegenseitig und greifen ineinander. Zur erworbenen Immunabwehr gehören z.B. die Antikörper-Produktion durch B-Zellen oder die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität (Andersen et al., 2006). Die Schlüsselrolle nehmen dabei T-Zellen ein, welche im Knochenmark entstehen und im Thymus reifen (Andersen et al., 2006). In der Folge kommt es zur Reorganisation von Gensegmenten und der Entstehung eines spezifischen T-Zell Rezeptors (TCR) (Andersen et al., 2006). Dieses transmembrane Antigen-Bindungsmolekül besteht aus einer TCR- $\alpha$  und TCR- $\beta$  Region und bindet antigene Epitope (Moss et al., 1992). T-Zellen-Antigene können jedoch nur binden, wenn sie durch Antigenpräsentierende Zellen (APZ) zu kurzen Peptiden prozessiert und im MHC-Molekül (*major histocompatibility complex*) präsentiert werden, welches als MHC-Restriktion bezeichnet wird (Quaratino et al., 1995). Die langjährige Annahme, dass ein T-Zell-Rezeptor spezifisch für ein einziges Epitop ist, gilt inzwischen als überholt. Es wird vermutet, dass eine T-Zelle etwa  $1 \times 10^6$  strukturell-ähnliche MHC-assoziierte Epitope erkennen kann (Mason, 1998). Darüber hinaus existieren verschieden modifizierte Peptid Liganden, die zu unterschiedlichen Immunantworten führen: Agonisten bzw. stimulatorische Liganden (Aktivierung, klonale Expansion und Differenzierung der T-Zelle), Partial-Agonisten (Induktion der Zytokinproduktion und Zytolyse, jedoch keine T-Zell-Proliferation) und Antagonisten (mögliche Inhibition T-Zell-Aktivierung) (Andersen et al., 2006; Anderton and Wraith, 2002; Kilgore et al., 2004).

Zur Aktivierung einer zytotoxischen T-Zelle bedarf es zusätzlich zu einer spezifischen T-Zell-Rezeptor-Bindung des Antigens, co-stimulierende Signale, wie die Interaktion von CD28 (auf der T-Zelle) mit B7 (auf APZ), sowie CD28 mit CD80/86 (auf dendritischen Zellen) (Andersen et al., 2006). Daraus resultieren die Proliferation und IL-2-Ausschüttung der T-Zelle. Zur Herunterregulation der T-Zelle kommt es hingegen durch Interaktion von B7 mit CTLA-4 (Greenfield et al., 1998).

Zudem ist die T-Zell-Aktivierung abhängig von der Stabilität der Bindung zwischen Antigen und MHC-Molekül und der Antigen-Dichte auf den APZs (Anderson and Wraith, 2002).

In Abhängigkeit zum Differenzierungsstatus der T-Zelle entwickelt sich diese zunächst von einer naiven T-Zelle zu einer Gedächtnis-T-Zelle, sodass sie die Zielzelle nicht direkt töten kann, aber proliferiert und Zytokine nach Antigen-Bindung bildet (Andersen et al., 2006). Letztlich entwickelt sie sich zur Effektor-T-Zelle (Interferon- $\gamma$ -, Granzym- und Perforin positiv) (Andersen et al., 2006). Die Zytotoxizität nimmt dabei im Verlauf zu und die Oberflächenmarker verändern sich (Andersen et al., 2006). Reife T-Lymphozyten lassen sich anhand ihrer Zelloberflächenmoleküle in T-Helferzellen (CD4+) oder zytotoxische T-Zellen (CD8+) einteilen (Andersen et al., 2006). In Abhängigkeit zu ihrem Zytokinsekretionsprofilen können beide in zwei Subtypen eingeteilt werden: T-Helferzellen Typ 1 (Th1) und zytotoxische T-Zellen vom Typ 1 (Tc1). Beide produzieren vornehmlich IFN- $\gamma$  und induzieren in ihren Zielzellen Apoptose mittels Perforin oder Fas-vermittelt (Andersen et al., 2006). Die Th2- und Tc2- Zellen sezernieren hauptsächlich IL-4 und IL-5 und agieren Perforin-vermittelt (Dobrzanski et al., 2004). Die Rolle der CD8+ T-Zellen besteht darin, virusinfizierte Körperzellen und Tumorzellen zu zerstören (Andersen et al., 2006). Sie können Zielzellen auf drei verschiedenen Wegen zerstören: direkt durch Granzym B- und Perforin-Ausschüttung in den interzellulären Zwischenraum zur Zielzelle hin, indirekt über die Sekretion von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und Interferon- $\gamma$  (was zur Apoptoseinduktion über die Caspasekaskade führt) und die Apoptoseinduktion mittels Fas-Ligand auf der T-Zelle und Fas-Rezeptor (CD95) auf der Zielzelle (Andersen et al., 2006).

#### **1.4 MicroRNA**

*MicroRNAs* (miRNAs) gehören zu der Gruppe der *small RNAs* und interagieren mit den dazugehörigen spezifischen *messenger RNAs* (mRNAs). Mit einer Länge von 21-23 Nukleotiden (nt) regulieren miRNAs als hoch konservierte und nicht-codierende RNAs die Gen-Expression auf post-transkriptioneller Ebene (Bartel, 2004; He and Hannon, 2004). 1993 erstmals von Lee et al. beschrieben, bekam die miRNA ihren Namen im Jahr 2001 (Lee et al., 1993; Ruvkun, 2001). Lee fand heraus, dass das Gen *lin-4* im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)

nicht für ein Protein codierte, sondern für zwei kleine RNA-Molekül (Lee et al., 1993). Das ungefähr 60 nt lange Molekül stellt die pre-miRNA lin-4 dar und das ca. 20 nt lange die reife miRNA lin-4. Die miRNA lin-4 reguliert das Gen lin-14 (Lee et al., 1993). Hierfür bindet es sich durch Basenpaarung komplementär an die 3'-UTR der lin-14-mRNA und vermindert die Translation der mRNA (Lee et al., 1993).

Dieser Mechanismus der Genregulation konnte auch bei Tierversuchen festgestellt werden, welche je nach Komplementarität der Bindesequenz und der beteiligten Proteine entweder an der Translation gehemmt oder durch Zerschneiden abgebaut werden (Wienholds and Plasterk, 2005). Partielle Komplementarität leitet eine Translationshemmung der Ziel-mRNA ein, während perfekte Basenpaarung zur Degradation der Ziel-mRNA führt (Vasudevan et al., 2007). miRNAs fungieren als wesentliche Regulatoren der Translation nach der Transkription (Bartel, 2004), durch spezifische Anhaftung an mRNA-Molekülen, deren Übersetzung in Proteine entsprechend erschwert, völlig verhindert oder auch erleichtert wird (Gangaraju and Lin, 2009; Kim et al., 2009). Die Entdeckung einer zusätzlichen miRNA (let-7) konnte aufzeigen, dass das *C. elegans* womöglich kein seltenes Phänomen darstellt. Let-7 reguliert das Gen lin-41 (Reinhart et al., 2000). Bei let-7 und lin-41 handelt es sich um evolutionär konservierte Gene, so dass sich daraus schließen lässt, dass der Mechanismus der miRNA-Regulation auch auf andere multizelluläre Organismen anwendbar sein könnte (Wienholds and Plasterk, 2005). Dies wird auch beim Vergleich von Wirbellosen- und Wirbeltierzellen deutlich (Kim et al., 2009).

Weiterhin unbekannt sind die biologischen Funktionen der überwiegenden miRNAs. Einige Studien legen nahe, dass jede miRNA einige mRNA-Moleküle reguliert und nach Berechnungen könnten etwa 20-30% der Gene im menschlichen Genom durch miRNAs mitgesteuert werden (Lewis et al., 2005; Xie et al., 2005). Es konnten bereits zahlreiche unterschiedliche miRNAs in Lebewesen nachgewiesen werden. Bei Mäusen sind über 1914 und beim Menschen über 2654 miRNA-Spezies bekannt (Kozomara et al., 2019). Man nimmt an, dass zwischen mehreren hundert, bis wenige tausend unterschiedliche miRNAs codiert werden (Wienholds and Plasterk, 2005).

## 1.5 Die Rolle von miRNAs bei Autoimmunerkrankungen

Der Einfluss von miRNAs auf Autoimmunerkrankungen ist bisher nur unvollständig untersucht. Nach aktueller Datenlage wird den miRNAs eine wichtige Funktion bei der Regulation des Immunsystems zugesprochen. So hat man beispielsweise zeigen können, dass das Ausschalten vereinzelter individueller miRNAs die Immunentwicklung und -regulation schwer kompromittiert und somit den Einfluss von miRNAs in der Pathophysiologie der Immunität sowie der Autoimmunität impliziert (Croce and Calin, 2005; Xiao and Rajewsky, 2009). Die Gruppe um Li Q-J et al. fand heraus, dass die miRNA-Expression in T-Zellen sich während ihrer Reifung dynamisch verändert und je nach Regulation eine unterschiedliche Sensitivität und damit Auswirkung auf die Immunantwort hat (Li et al., 2007). Andere Studien berichten von der Beteiligung von miRNAs in der Immunzellentwicklung (Chen et al., 2004; Neilson et al., 2007; Zhou et al., 2007). Diese Studien demonstrieren, dass unter anderem die miRNA 150, 155 und 181a wichtige Regulatoren von B- und T-Zellentwicklung sind und eine entscheidende Rolle für das funktionell adaptive Immunsystem spielen (Chen et al., 2004; Zhou et al., 2007). Die Entdeckung einiger Schlüsselproteine in der Biogenese von miRNAs, Drosha/DGCR8, Dicer und Argonautes in Säugern, hat die nicht-selektive oder teilselektive Ausschaltung hunderter miRNAs ermöglicht, während die Proteinkodierenden Gene intakt bleiben (Kim et al., 2009; O'Carroll et al., 2007). Die selektive Deletion von Dicer (Harfe et al., 2005; Kanellopoulou et al., 2005) und anderer Schlüsselproteine in individuellen Immunzelluntergruppen haben gezeigt, dass miRNAs von entscheidender Bedeutung für die B-Zell-, natürliche Killerzell- (NK), natürliche Killer-T-Zell- (NKT), T-Zell-Entwicklung, Funktion und Abstammungsstabilität von terminal differenzierten Lymphozyten sind (Chong et al., 2008; Koralov et al., 2008). Aus den bisherigen Ergebnissen dieser Zellkultur- und Tierstudien kann geschlussfolgert werden, dass eine korrekte miRNA Regulation ist entscheidend für die Vorbeugung von Autoimmunität sowie die normalen Immunfunktionen.

## 1.6 Ziel der Studie

Das miRNAs wichtige regulatorische Funktionen besitzen ist in der Literatur bereits beschrieben worden. Die Vermutung liegt daher nahe, dass miRNAs auch bei AIT eine wichtige Rolle einnehmen. Interessanterweise gibt es bezüglich AIT und miRNA keine bzw. nur sehr wenige Daten. Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Schott und Dr. Bernecker hat diesbezüglich erste Untersuchungen durchgeführt (Bernecker et al., 2012). Es wurde eine Gruppe von miRNAs bei AIT- und Kontrollgruppen aus Schilddrüsengewebe und PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) bestimmt, die im Verdacht stehen, immuno-regulatorisch wirksam zu sein. Tatsächlich wurden unterschiedliche Expressionen dieser miRNAs festgestellt, die Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen sein sollten. Aus den Ergebnissen konnte die Hypothese abgeleitet werden, dass die vermutete Expression der definierten miRNAs durch eine Infiltrierung aktivierter Lymphozyten verursacht werden könnte. Es konnte in dieser Studie ein massiver Anstieg dieser Lymphozyten-Populationen gezeigt werden, die im Schilddrüsengewebe an HT oder MB erkrankter Patienten von immigrierten aktivierten Lymphozyten (CD4+ und CD8+) stammen. Ziel der vorliegenden Studie war es, diese These durch die Analyse der definierten miRNAs in zirkulierenden CD4+ und CD8+ T-Zellen im peripheren Blut betroffener Patienten weiter zu erhärten. Folgende Fragen sollten im Einzelnen abgeklärt werden:

- Werden sich die ausgewählten miRNAs der AIT-Gruppen in den CD4+ und CD8+ T-Zellen von denen in der Kontrollgruppe unterscheiden und sich die Ergebnisse mit den vorher postulierten Daten decken oder werden unterschiedliche Regulationen oder auch keine gefunden?
- Wie werden die Ergebnisse zu interpretieren sein?
- Wie sind die Ergebnisse hinsichtlich anderer Autoimmunerkrankungen zu bewerten?
- Wird ein Zusammenhang feststellbar sein?

Die Ergebnisse und Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit sollen wichtige Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen zu Tage legen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Ethikvotum**

Alle Experimente der vorliegenden Untersuchung wurden gemäß den Prinzipien der Helsinki Deklaration (2004) durchgeführt. Die Genehmigung der Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Aktenzeichen Nr. 3354) erteilt.

### **2.2 Patienten und Kontrollen**

Die Studienteilnehmer wurden im Rahmen von Routine- und Verlaufsuntersuchungen in der Ambulanz der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums Düsseldorf akquiriert. Hierbei erhielten alle Patienten eine Aufklärung durch einen Facharzt sowie eine schriftliche Information zur Studie. Alle Teilnehmer gaben eine schriftliche Einverständniserklärung ab. Über die Blutabnahme in der endokrinologischen Ambulanz hinaus fanden keine weiteren invasiven Maßnahmen statt. 59 Probanden erfüllten die Studienbedingungen und wurden in die Studie aufgenommen. Die MB-Gruppe bestand aus insgesamt n=19 Probanden und setzte sich zusammen aus 13 Frauen und 6 Männern im Alter von 20 bis 83 Jahren (Mittelwert 48 Jahre). Zur HT-Gruppe zählten 21 HT-Patienten im Alter von 12 bis 67 Jahren (Mittelwert 40 Jahre, 19 Frauen und 2 Männer). Zur n=19 starken Kontrollgruppe gehörten Strumapatienten sowie gesunde Probanden zwischen 22 bis 79 Jahren (Mittelwert 42,25 Jahre, 12 Frauen und 7 Männer). Die CD4+ und CD8+ T-Zellaufreinigung wurde bei je 10/10/10 Patienten durchgeführt und die PBMCs bei 19/19/21 Patienten.

#### **2.2.1 Kriterien HT-Gruppe**

Als Patient für die HT-Gruppe kam man nur in Frage, wenn folgende Kriterien eingehalten wurden:

- Labortechnisch dreifache Erhöhung der TPO-AK über der Normalkonzentration im Serum
- Sonografie zeigt ein diffuses, echoarmes Schilddrüsenparenchym

## Medikation

18 von 21 HT-Patienten wurden mit L-Thyroxin in verschiedenen Dosen (50-100µg pro Tag) behandelt. Die medikamentöse Behandlungsdauer der HT-Patienten erstreckte sich von mindestens sechs Monaten bis hin zu zwölf Jahren. Alle HT-Patienten waren euthyreot.

### **2.2.2 Kriterien MB-Gruppe**

Folgende Kriterien wurden für die MB-Gruppe festgelegt:

- Labortechnisch dreifache Erhöhung der TRAK
- Sonografie zeigt ein echoarmes, hypervaskularisiertes Schilddrüsengewebe

## Medikation

Bei der Blutentnahme waren alle MB-Patienten unter thyreostatischer Therapie mit Methimazol oder Carbimazol. Die medikamentöse Behandlungsdauer erstreckt sich von einer Woche bis zu sechs Monaten. 13 von 19 Probanden waren hyperthyreot, 6 euthyreot.

### **2.2.3 Kontrollgruppe**

Die Kontrollgruppe bestand aus Patienten ohne Autoimmunerkrankung:

- alle Normwerte eingehalten:
  - TSH: 0,4 – 3,6 µU/ml = Euthyreose
  - Freies Trijodthyronin (fT3): 2,0 - 4,4 pg/ml Serum
  - Freies Thyroxin (fT4): 0,8 - 1,8 ng/dl Serum
- Sonografisch kein Nachweis auf autoimmun oder maligne Schilddrüsengewebe
- alle 19 Patienten der Kontrollgruppe waren euthyreot

#### 2.2.4 Ausschlusskriterien

Ausgeschlossen wurden Patienten mit maligner Neoplasie inklusive Schilddrüsenkarzinom oder zurzeit aktiven beliebigen anderen Neoplasien in der Anamnese. Klinisch diagnostizierte chronische oder akute Infektionen, welche durch Untersuchung, Messung des C-Reaktiven Proteins (CRP) und der Blutzahl auftraten, wurden ebenfalls ausgeschlossen.

#### 2.2.5 Blutwerte

Die Grunddaten beinhalten die Schilddrüsen-Antikörper, den Hormongehalt an fT3, fT4 und TSH, ein Blutbild sowie einen CRP-Wert. Kein Patient litt an einem anderen Immunprozess.

#### 2.2.6 Blutentnahme

Bei einer routinemäßigen Blutentnahme wurde peripheres venöses Blut von den Patienten in *PAXgene Blood RNA Tubes* (Qiagen, Deutschland) und in heparinisierten CPT-Röhrchen (*Vacutainer Cell Preparation Tubes* von BD Bioscience) entnommen.

### 2.3 Material

#### 2.3.1 Geräte

Gerät	Gerätebezeichnung	Firma/Firmensitz
Photometer	NanoDrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen,
Real time PCR Cycler	ABI PRISM 7700 Sequence Detector	Applied Biosystems; Carlsbad, USA
Durchfluss- zytometer	FACS Calibur™	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
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	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland

**Tabelle 1: Geräte**

### 2.3.2 Einmalmaterialien

Material	Materialbezeichnung	Firma/Firmsitz
Pipettenspitzen	Pipettenspitzen TipOne <sup>®</sup> : 0,1-10 µl Extended Length Filter Tips 1-200 µl Graduated Filter Tips 1-100 µl Beveled Filter Tips 101-1000 µl Extended Length Filter Tips	StarLab, Ahrensburg, Deutschland
	Pipettenspitzen: research: 50 µl, 100 µl, 1000 µl variable: 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	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
	Cryo.s <sup>™</sup> , Einfrierröhrchen, 1ml	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, Deutschland
	Falcon <sup>™</sup> 5ml Polystyrene Round-Bottom	
	PAXgene Blood RNA Tubes	Qiagen, Hilden, Deutschland
	PAXgene Spin Columns	
	PAXgene Shredder Spin Columns	
Collection tubes 1,5ml und 2,0ml		

PCR	Real time PCR Platte (96-well) MicroAmp®	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
	Optical Adhesive Film MicroAmp®	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Filter	BD Falcon Cell Strainer	BD Bioscience, San Jose, CA, USA

**Tabelle 2: Einmalmaterialien**

### 2.3.3 Lösungen, Zusätze und Puffer

Lösung, Zusatz und Puffer	Firma/Firmensitz
Aquadest: Spüllösung/Irrigation Solution 1000	Deltaselect GmbH, Pfullingen, Deutschland
Erylysepuffer: Buffer EL Erythrocyte lysis buffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
20% DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, München, Deutschland
MACS Puffer	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Qiazol Lysis Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
RLT Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
80% FCS-Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
DPBS	Gibco, Massachusetts, USA

**Tabelle 3: Lösungen, Zusätze und Puffer**

### 2.3.4 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Chemikalie / Reagenz / Kit	Firma/Firmensitz
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (96-100%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol (100%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
miRNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
miScript II RT Kit	
miScript Primer Assays	
miScript SYBR Green PCR Kit	

PAXgene Blood miRNA Kit	
TE-Puffer (pH 8,0)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
CD4 MicroBeads human	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
CD8 MicroBeads human	
Pan T Cell Isolation Kit human	

**Tabelle 4: Chemikalien, Reagenzien und Kits**

### 2.3.5 Oligonukleotide / Primer

Primer Assay	Sequenz
RNU6B_3	
miRNA 34a_1	keine Sequenz gelistet
miRNA 143_1	5'UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC
miRNA 146a_1	5'UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
miRNA 155*_1	5'CUCCUACAUAUUAGCAUUAACA
miRNA 155_2	keine Sequenz gelistet
miRNA 181a*_1	5'ACCAUCGACCGUUGAUUGUACC
miRNA 181b_1	keine Sequenz gelistet
miRNA 200a_1	keine Sequenz gelistet
miRNA 200a*_2	keine Sequenz gelistet

**Tabelle 5: Oligonukleotide / Primer**

## 2.4 Methoden

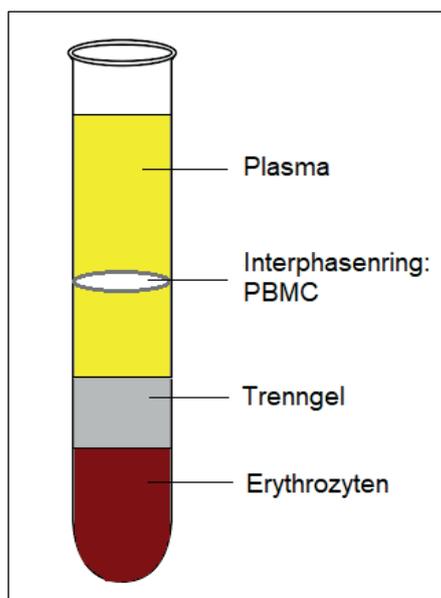
### 2.4.1 Weiterbehandlung der Blutproben

Die *PAXgene Blood Tubes* wurden bei Zimmertemperatur für mindestens vier Stunden inkubiert, bevor eine Weiterbearbeitung stattfand (siehe Kapitel 2.4.4 RNA-Isolation). Die heparinisierten Blutproben in CPT-Röhrchen wurden anhand der Dichtegradientenzentrifugation bei 3100 *revolutions per minute* (rpm) und

20 °C für 20 Minuten zentrifugiert, um daraus die PBMCs zu gewinnen. Konnten die Proben nicht noch am gleichen Tag bearbeitet werden, wurden sie kryokonserviert. Die *PAXgene Blood Tubes* wurden dafür bei -80 °C weggefroren.

#### 2.4.2 Isolierung der peripheren mononukleären Zellen

Die Isolierung der PBMCs aus dem Vollblut, zu denen T- und B-Zellen, Dendritische Zellen, NK und Monozyten gehören, erfolgte, wie zuvor beschrieben, mittels Dichtegradientenzentrifugation. Mit Hilfe dieses Arbeitsschritts wurden die Zellen vom Plasma getrennt. Am unteren Ende des CPT-Röhrchens landen aufgrund ihrer Dichte die Erythrozyten und es bildet sich in der Mitte ein weißer Interphasenring, der die PBMCs enthält (siehe Abb. 1).



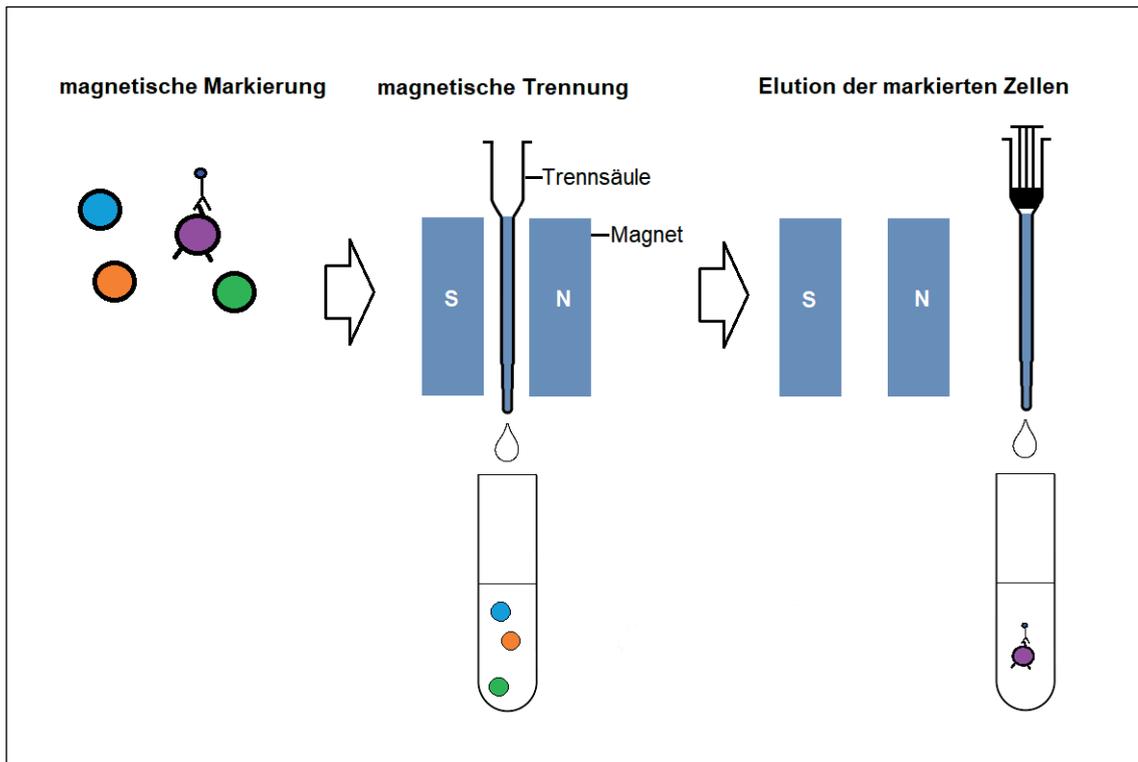
**Abb. 1: CPT-Röhrchen mit zentrifugiertem Vollblut**

Die CPT-Röhrchen wurden in einer Zentrifuge mit ausschwingenden Röhrchenhaltern platziert und zentrifugiert. Der Rotor wird ungebremst auslaufen gelassen, um die Dichtegradienten nicht zu verwirbeln. Ein Großteil des Plasmas wurde verworfen. Darauf folgend wurde der weiße Interphasenring mit dem Restplasma abpipettiert und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gefüllt. Zur Gewinnung der maximalen Zellzahl, wurde das CPT-Röhrchen nochmals mit DPBS-Puffer nachgespült und die Suspension entnommen. Anschließend wurde ein Waschgang mit DPBS-Puffer

und die folgende Zentrifugation durchgeführt. Enthielt das Zellpellet noch zu viele Erythrozyten, wurde es mit 4-8 ml Erylysepuffer resuspendiert, gefiltert (gelbe Filter) und zur Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten abgedeckt. Anschließend wurde das Röhrchen mit DPBS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert. Das Pellet konnte nach zweimaligem Waschgang mit DPBS-Puffer und folgender Zentrifugation resuspendiert werden. Anschließend konnte die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. Sofern zeitlich eine Isolierung der CD4+ und CD8+ T-Zellen aus den PBMCs nicht mehr erfolgen konnte, wurden diese in 1 ml Kryoröhrchen überführt und in einem Isopropanol-basierten Gefrierbehälter bei -80 °C eingefroren. Das hierfür eingesetzte Einfriermedium (20% DMSO und 80% fetalem Kälberserum) wurde 1:1 mit der Zellsuspension vermischt.

#### **2.4.3 CD4+ und CD8+ Isolation aus PBMCs**

Für die Isolierung der CD4+ und CD8+ T-Zellen aus den PBMCs, wurde das magnetische Zellsortierungsverfahren MACS (*magnetic activated cell sorting*) verwendet. Bei dieser Methode binden sich mit Magnetpartikeln gekoppelte Antikörper (*MicroBeads*) an spezifische Zelloberflächenmoleküle (Miltenyi et al., 1990). Die Zellsuspension fließt durch eine Säule bzw. ein Rohr, an der sich ein starkes Magnetfeld befindet, wobei die mit *MicroBeads* versehenen Zellen im Magnetrohrchen hängen bleiben, während der Rest hindurchfließt. Handelt es sich bei den magnetisch markierten und herausgefilterten Zellen um die Zielzellen, spricht man von einer positiven Selektion (siehe Abb. 2). Bei einer negativen Selektion werden alle anderen Zellen, außer den Zielzellen, markiert.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der magnetischen Zellseparation MACS**

Zunächst wurde eine negative Selektion aller T-Zellen mittels *human Pan T Cell Isolation Kit* von Miltenyi nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Hierbei werden alle nicht-T-Zellen, mit Bead-gekoppelten und Biotin-gekoppelten Antikörpern markiert und aussortiert. Nach Zellzahlbestimmung der PBMCs anhand der Neubauer-Zählkammer wurden diese in 40 µl MACS-Puffer resuspendiert und mit 10 µl *Pan T Cell Biotin-Antibody Cocktail* vermischt. Zuvor wurden alle Puffer/*Cocktail*/*Beads* Mengen je nach Zellzahl berechnet. Nach 5-minütiger Inkubation im Kühlschrank wurden 30 µl MACS-Puffer und 20 µl *Pan T Cell MicroBead Cocktail* hinzugefügt und vermischt. Nach weiteren 10 Minuten im Kühlschrank und einem Waschgang mit 2 ml MACS-Puffer wurde erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml MACS-Puffer aufgenommen. Die gewählte magnetische Filtersäule in der Größe LS (*MACS® Separation Columns* von Miltenyi, geeignet für  $2 \times 10^9$  Zellen) wurde in der Magnetbank platziert, mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert und anschließend die Zellsuspension hineingefüllt. Nach dreimaligem Nachspülen mit je 3 ml MACS-Puffer wurde die Durchlauf Flüssigkeit, die nur ungelabelte T-Zellen enthielt, zentrifugiert. Mit Hilfe der gewonnenen T-Zellen erfolgt anschließend die Isolation der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Mittels humaner

CD4 und CD8 *MicroBeads* (enthalten Antikörper gegen CD4+ und CD8+) erfolgte eine positive Selektion der gewünschten T-Zellen. Die ungelabelten T-Zellen wurden mit 20 µl humanen CD4 und CD8 *MicroBeads* und 80 µl MACS-Puffer vermischt und für 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nach Hinzugabe von 1 ml MACS-Puffer wurde wieder zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen. Die gewählte magnetische Filtersäule der Größe MS (*MACS® Separation Columns* von Miltenyi, geeignet für  $2 \times 10^8$  Zellen) wurde in der Magnetbank platziert, mit 500 µl MACS-Puffer äquilibriert und daraufhin die Zellsuspension hineingefüllt. Die magnetischen Filtersäulen wurden nach dreimaligem Nachspülen mit 500 µl MACS-Puffer auf leere Röhrchen gesetzt und mit 500 µl MACS-Puffer zweimal nachgespült und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wurde mit je 350 µl RLT Puffer (1 ml + 10 µl 2-Mercaptoethanol) vermischt und bei -80 °C weggefroren oder die RNA-Isolation durchgeführt.

Die Reinheit der Trennung wurde anhand von 3 Kontrollpatienten überprüft. Hierfür wurde zunächst die CD4+ und CD8+ T-Zell-Isolation durch magnetische Zellseparation nach Herstellerangabe ausgeführt. Abschließend wurde die Reinheit der Trennung mit Hilfe eines FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) (siehe Abb. 3) evaluiert. Alle Kontrollen wiesen einen Reinheitsgrad von über 90% auf.

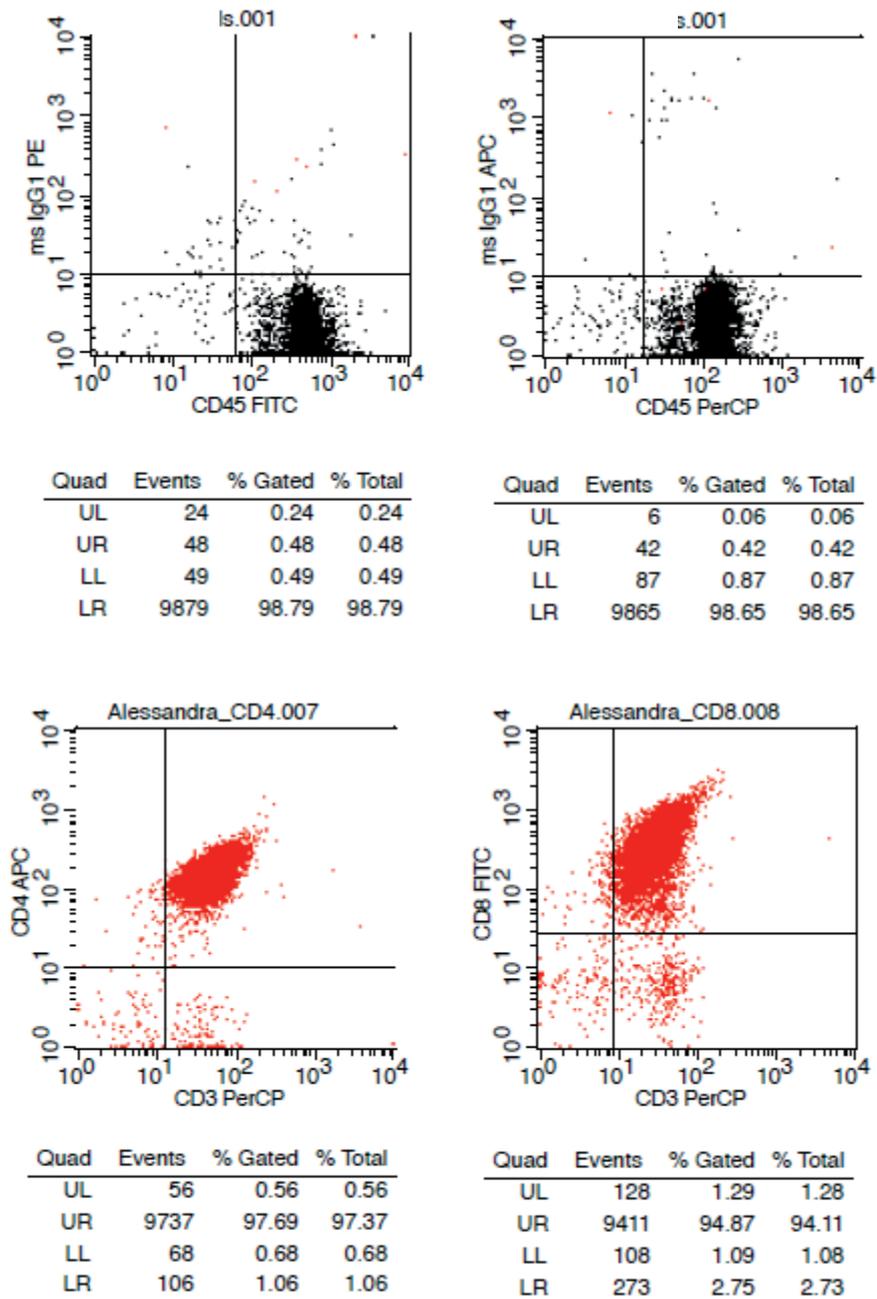


Abb. 3: Exemplarische FACS-Analyse, um die Reinheit der CD4+ und CD8+ T-Zellgewinnung durch magnetische Zellseparation zu demonstrieren

### 2.4.4 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurde das *PAXgene Blood miRNA Kit* (für die *PAXgene Blood RNA Tubes*) nach Angaben des Herstellers durchgeführt (siehe Abb. 4).

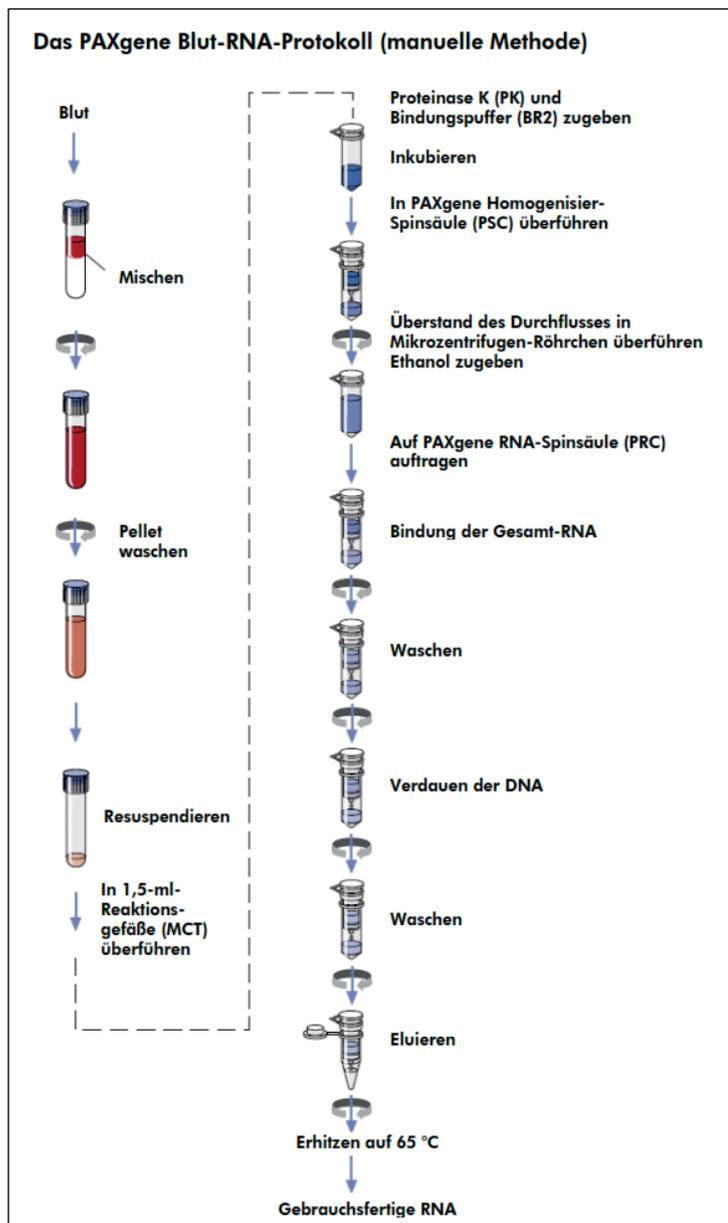
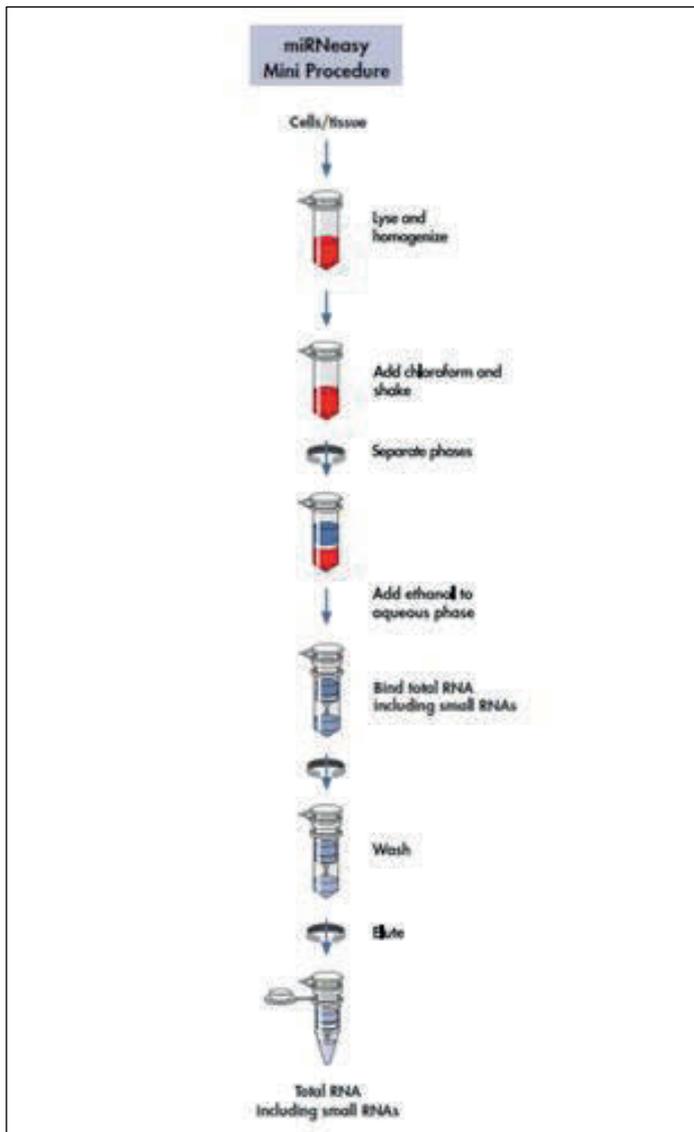


Abb. 4: Das PAXgene Blut-RNA-Protokoll (manuelle Methode) (Qiagen, 2022)

Zur Isolierung wurde das venöse Blut in *PAXgene Blood RNA Tubes* gesammelt. Diese Monovetten beinhalten ein gesetzlich geschütztes Reagenz, das die Blutzellen lysiert und anschließend die RNA stabilisiert. Die RNA-Stabilisierung ist entscheidend für die Analyse der Genexpression. Nach einem Zentrifugationsschritt, bei dem die Nukleinsäuren im *PAXgene Blood RNA Tube* pelletieren, wurde das Pellet gewaschen und resuspendiert. Das resuspendierte Pellet wurde zunächst in einem optimierten Puffer mit Proteinase K (PK) inkubiert, um die Proteine zu verdauen. Eine weitere Zentrifugation durch eine *PAXgene* Homogeni-

sier-Spinsäule (PSC) dient der Homogenisation des Zelllysats und der Entfernung restlicher Zelltrümmer. Der Überstand der Durchfluss-Fraktion wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mit dem anschließend hinzugefügten Ethanol werden optimale Bindungsbedingungen eingestellt und das Lysat wird auf die *PAXgene* RNA-Spinsäule (PRC) aufgetragen. Bei der nachfolgenden kurzen Zentrifugation bindet RNA selektiv an die *PAXgene* Silica-Membran, während Kontaminationen diese passieren. Die restlichen Kontaminationen werden in diversen effizienten Waschschrritten entfernt. Zwischen erstem und zweitem Waschschrift wird die Membran mit *DNase I* (RNFD) inkubiert, um eventuell gebundene Reste von DNA zu entfernen. Im Anschluss an die Waschschrritte wird die RNA in Elutionspuffer (BR5) eluiert und durch Hitze denaturiert. Wurden die RNA-Proben nicht sofort weiterverwendet, konnten sie bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  oder  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Die RNA-Isolation bei den zuvor isolierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde mit dem *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen, Deutschland) nach Herstellerprotokoll bewerkstelligt (siehe Abb. 5).



**Abb. 5: miRNeasy Mini Verfahren (Qiagen, 2020)**

Die Zellen wurden in einer Konzentration nach Herstellervorgabe mit *Qiazol Lysis Reagent (miRNeasy Mini Kit, Qiagen, Deutschland)* in Lösung gegeben, lysiert und homogenisiert. Nach Zugabe von Chloroform trennt sich das Homogenisat durch Zentrifugation in zwei Phasen auf, einer wässrigen und einer organischen Phase, wobei sich die RNA-Anteile an der oberen, wässrigen Phase befinden. Nach dem Trennen der Phasen wurde zur wässrigen Phase Ethanol hinzugefügt. Durch Zentrifugation in *RNeasy Mini Spin Columns* hat sich die RNA (miRNA inbegriffen) an die Membran der Röhrcchen gebunden. Anschließend erfolgte eine Waschung mit RWT- und RPE-Puffer. Die totale RNA wurde mit RNase-freiem Wasser (40 µl pro Probe) eluiert, in Sammelröhrcchen (1,5 ml) aufgefangen und bei -80 °C weggefroren.

### 2.4.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Mit Hilfe des Photometers *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* (peqlab Biotechnologie GmbH, Germany) wurde anschließend die Menge gewonnener RNA aus PBMCs, CD4+ und CD8+ T-Zellen bestimmt. Die RNA-Konzentration (in ng /  $\mu$ l) wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Zellproben wurden bei -80 °C für weitere Untersuchungen aufbewahrt.

### 2.4.6 cDNA-Synthese

Nach der Konzentrationsbestimmung wurde die isolierte RNA mit Hilfe des *miScript II RT Kits* (Qiagen, Hilden) durch eine Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) in cDNA umgeschrieben. Bei der RT-Reaktion werden die miRNAs am 3'-Ende durch Poly(A)-Polymerase polyadenyliert. Es folgt anschließend eine reverse Transkriptase unter Nutzung von oligo-dT Primern in cDNA (siehe Abb. 6).

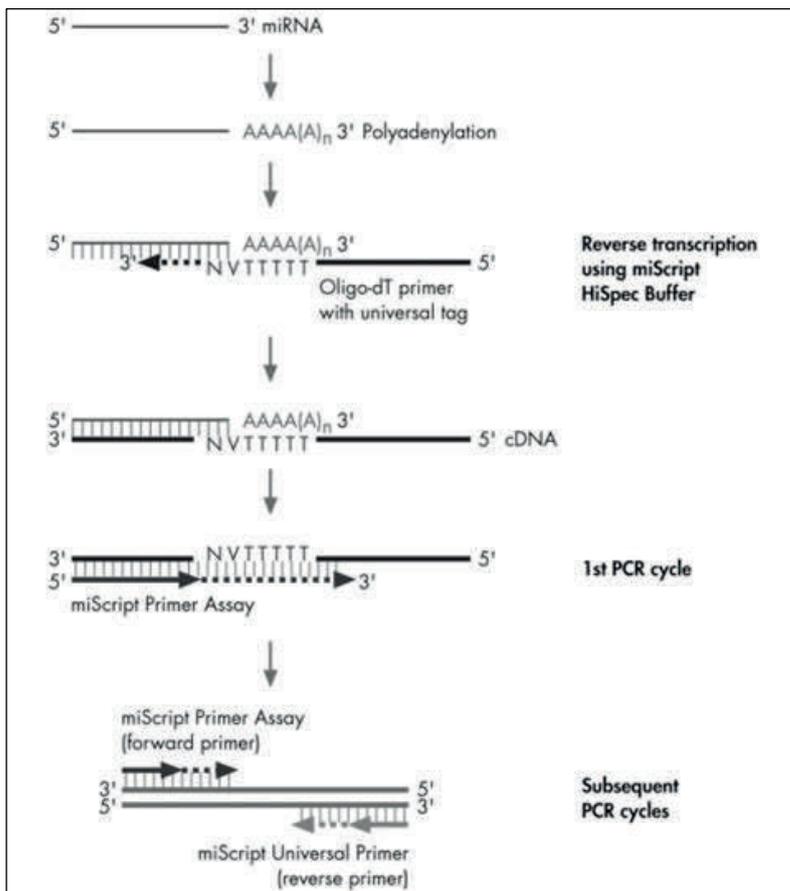


Abb. 6: Selektive Umwandlung von reifen miRNAs in cDNA in miScripts HiSpec-Puffer (Qiagen, 2011)

Das *miScript II RT Kit* wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die RT-Reaktion ergab sich ein Endvolumen von 20 µl aus einer Zusammensetzung von *HiSpec Buffer*, *miScript Nucleics Mix*, *miScript RT Mix* sowie einem Gemisch aus RNase-freiem Wasser und isolierter RNA (siehe Tabelle 6).

Menge (µl)	Reagenzien
4	HiSpec Buffer
2	miScript Nucleics Mix
2	miScript RT Mix
12	RNase free water und RNA

**Tabelle 6: Zusammensetzung miScript II RT Kit**

Die Menge an RNA wurde berechnet, sodass sich eine Konzentration von 200 ng RNA pro 20 µl Endvolumen ergab. Das restliche Volumen für das RNase-freie Wasser berechnete sich aus der Differenz des Mastermixes (*HiSpec Buffer*, *miScript Nucleics Mix*, *miScript RT Mix*) und der errechneten RNA-Menge. RNase freies Wasser und RNA-Menge ergaben insgesamt ein Volumen von 12 µl. Das Gemisch von 20 µl wurde für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 5 Minuten bei 95 °C, um den *miScript RT-Mix* zu inaktivieren und dann bei -20 °C aufzubewahren (siehe Abb. 7).

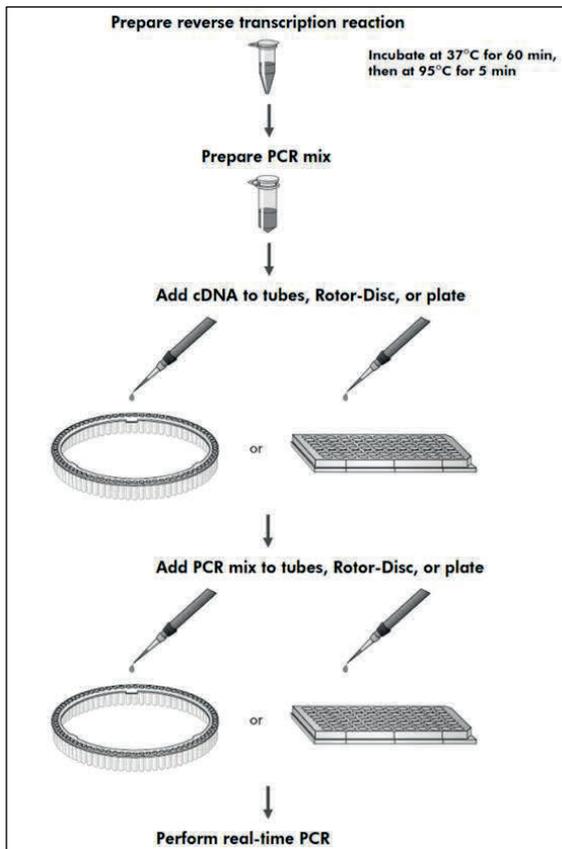


Abb. 7: miScript PCR-System Arbeitsablauf (Qiagen, 2011)

#### 2.4.7 Quantitative Real time Polymerase-Kettenreaktion

Das Verfahren der quantitativen *Real time* Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode von Nukleinsäuren, welches auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und darüber hinaus die Quantifizierung der gewonnenen DNA (in diesem Fall cDNA von miRNA) ermöglicht. Hierzu wurden spezifische *Primer Assays* und das *miScript SYBR Green PCR Kit* nach Herstellervorgabe verwendet. Mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen wird die Quantifizierung der in Echtzeit erfassten PCR-Produkte durchgeführt. Durch die Verwendung des *SYBR Green PCR Master Mix* des *miScript SYBR Green PCR Kits* wird diese Fluoreszenz erreicht. Hierbei interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff (*SYBR Green*) in die DNA bzw. bindet an die kleine Furche der doppelsträngigen DNA, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Mit der Zunahme der gefärbten Ziel-DNA nimmt im gleichen Maße die Fluoreszenz mit fortschreitendem PCR-Zyklus zu und es findet am Ende der Elongation in jedem PCR-Zyklus eine Messung statt. Die PCR-Reaktion fand bei

einem Endvolumen von insgesamt 25 µl pro Well (Mikrotiterplatte) und folgender Zusammensetzung statt (siehe Tabelle 7):

Menge (µl)	Reagenzien
12,5	SYBR Green PCR Master Mix
2,5	miScript Universal Primer
7	RNase free water
2,5	miScript Primer Assay
0,5	cDNA

**Tabelle 7: Zusammensetzung miScript PCR System**

Zur besseren Übersicht wurden Well-Schemata angelegt (siehe Abb. 8). Um schnell und effizient die 96-Well-Platten zu pipettieren, wurden im Vorfeld Mastermixe berechnet (diese bestanden aus den *miScript PCR System* Reagenzien ohne cDNA). Den Well-Schemata folgend wurden die Mastermixe pipettiert und jedes Well mit der entsprechenden cDNA befüllt. Jede Platte wurde mit einer Folie versiegelt und für 1 Minute bei Raumtemperatur und 1000 g zentrifugiert, um evtl. Luftblasen zu entfernen. Jede Probe wurde als Duplikat amplifiziert und quantifiziert. Als negative Kontrolle wurde RNase-freies Wasser verwendet. Die PCR wurde im *StepOne™ Real-Time PCR System* (PE Applies Biosystem, USA) durchgeführt (siehe Abb. 9).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Ziele
<b>A</b>													<b>RNU6 B</b>
<b>B</b>													<b>34a</b>
<b>C</b>													<b>143_1</b>
<b>D</b>													<b>146a_1</b>
<b>E</b>													<b>155*_1</b>
<b>F</b>													<b>155_2</b>
<b>G</b>													<b>181a*_1</b>
<b>H</b>													<b>181b1</b>
<b>Pro- ben</b>	B1	B1	B1 CD4	B1 CD4	B1 CD8	B1 CD8	B2	B2	B2 CD4	B2 CD4	NN	NN	

**Abb. 8: Beispielhaftes Well-Schema**

Experiment: miRNA\_A2-A2 CD4-A2  
CD8\_34\_a-200a\_1\_05042012

Applied Biosystems

Plate Grid Setup Report

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A2 RNUSB_3 Ct: 19.69	A2 RNUSB_3 Ct: 19.45	A2 RNUSB_3 Ct: 19.36	A2 CD4 RNUSB_3 Ct: 16.77	A2 CD4 RNUSB_3 Ct: 16.92	A2 CD4 RNUSB_3 Ct: 16.84	A2 CD8 RNUSB_3 Ct: 16.7	A2 CD8 RNUSB_3 Ct: 16.71	A2 CD8 RNUSB_3 Ct: 16.77	N RNUSB_3 Ct: Undetermin...	N RNUSB_3 Ct: Undetermin...	N RNUSB_3 Ct: Undetermin...
B	A2 34_a Ct: 30.82	A2 34_a Ct: 30.62	A2 34_a Ct: 30.75	A2 CD4 34_a Ct: 28.75	A2 CD4 34_a Ct: 28.79	A2 CD4 34_a Ct: 28.73	A2 CD8 34_a Ct: 28.35	A2 CD8 34_a Ct: 28.76	A2 CD8 34_a Ct: 28.91	N 34_a Ct: Undetermin...	N 34_a Ct: Undetermin...	N 34_a Ct: Undetermin...
C	A2 143_1 Ct: 32.91	A2 143_1 Ct: 32.57	A2 143_1 Ct: 32.92	A2 CD4 143_1 Ct: 34.69	A2 CD4 143_1 Ct: 34.22	A2 CD4 143_1 Ct: 34.5	A2 CD8 143_1 Ct: 34.24	A2 CD8 143_1 Ct: 34.05	A2 CD8 143_1 Ct: 34.98	N 143_1 Ct: Undetermin...	N 143_1 Ct: Undetermin...	N 143_1 Ct: Undetermin...
D	A2 146a_1 Ct: 19.87	A2 146a_1 Ct: 19.22	A2 146a_1 Ct: 18.99	A2 CD4 146a_1 Ct: 16.26	A2 CD4 146a_1 Ct: 16.65	A2 CD4 146a_1 Ct: 16.52	A2 CD8 146a_1 Ct: 16.85	A2 CD8 146a_1 Ct: 16.52	A2 CD8 146a_1 Ct: 14.95	N 146a_1 Ct: Undetermin...	N 146a_1 Ct: 17.29	N 146a_1 Ct: 32.37
E	A2 155_2 Ct: 29.54	A2 155_2 Ct: 29.69	A2 155_2 Ct: 29.55	A2 CD4 155_2 Ct: 25.68	A2 CD4 155_2 Ct: 25.88	A2 CD4 155_2 Ct: 25.95	A2 CD8 155_2 Ct: 25.75	A2 CD8 155_2 Ct: 25.97	A2 CD8 155_2 Ct: 25.92	N 155_2 Ct: Undetermin...	N 155_2 Ct: Undetermin...	N 155_2 Ct: Undetermin...
F	A2 181a_1 Ct: 33.29	A2 181a_1 Ct: 33.23	A2 181a_1 Ct: 32.95	A2 CD4 181a_1 Ct: 32.56	A2 CD4 181a_1 Ct: 32.57	A2 CD4 181a_1 Ct: 32.71	A2 CD8 181a_1 Ct: 31.4	A2 CD8 181a_1 Ct: 31.92	A2 CD8 181a_1 Ct: 31.72	N 181a_1 Ct: Undetermin...	N 181a_1 Ct: Undetermin...	N 181a_1 Ct: Undetermin...
G	A2 181b_1 Ct: 26.46	A2 181b_1 Ct: 26.32	A2 181b_1 Ct: 26.34	A2 CD4 181b_1 Ct: 25.81	A2 CD4 181b_1 Ct: 25.66	A2 CD4 181b_1 Ct: 25.8	A2 CD8 181b_1 Ct: 24.93	A2 CD8 181b_1 Ct: 24.82	A2 CD8 181b_1 Ct: 24.9	N 181b_1 Ct: Undetermin...	N 181b_1 Ct: Undetermin...	N 181b_1 Ct: Undetermin...
H	A2 200a_1 Ct: 36.87	A2 200a_1 Ct: 36.72	A2 200a_1 Ct: 37.09	A2 CD4 200a_1 Ct: 33.22	A2 CD4 200a_1 Ct: 32.64	A2 CD4 200a_1 Ct: 32.9	A2 CD8 200a_1 Ct: Undetermin...	A2 CD8 200a_1 Ct: 31.25	A2 CD8 200a_1 Ct: 32.26	N 200a_1 Ct: Undetermin...	N 200a_1 Ct: Undetermin...	N 200a_1 Ct: Undetermin...

**Abb. 9: Beispielhaftes Setup One Step**

Die PCR wurde in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Das Programm sah wie folgt aus:

1. Denaturierung der DNA-Doppelstränge bei 94 °C für 15 Sekunden
2. Hybridisierung der Primer an die Einzelstränge bei 55 °C für 30 Sekunden
3. Zweitstrang-Synthese durch thermophile Taq-Polymerase bei 70 °C für 30 Sekunden

Als letzter Schritt wurde eine Schmelzkurvenanalyse am Ende des qPCR-Laufs durchgeführt. Unter langsamer Temperaturzunahme (50 °C → 95 °C) wird die DNA „aufgeschmolzen“ (Gressner and Arndt, 2019). Sobald eine für das Fragment spezifische Schmelztemperatur erreicht wurde, denaturiert die doppelsträngige DNA zu zwei einzelsträngigen Molekülen, der Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green) wird freigesetzt und eine Änderung der Fluoreszenz aufgezeichnet. Eine Unterscheidung zwischen doppelsträngiger DNA von spezifischen PCR-Produkten und unspezifisch entstehende Primerdimere ist möglich, da spezifische PCR-Produkte einen höheren Schmelzpunkt aufweisen. Die Höhe des Schmelzkurven-Spitzenwerts stellt in etwa die Menge des gebildeten Fragments dar. Um akkurate und reproduzierbare Ergebnisse der definierten miRNAs zu erzielen,

wurde das humane (snRNA) RNU-6b als endogene Referenz RNA und interne Kontrolle verwendet. Die Verwendung einer internen Kontrolle ist elementar, da so eine Normierung der Proben möglich wird.

Zur Auswertung wurde die *Comparative cycle threshold* (Ct) Methode angewendet. Der Ct-Wert ist eine Größe, die das erstmalige exponentielle Wachstum der Fluoreszenzkurve über den Hintergrundwert beschreibt. Je mehr DNA in den Proben vor der PCR vorlag, desto schneller stieg das PCR-Produkt und damit die Fluoreszenzkurve über den Schwellenwert an. Die miRNAs von Interesse wurden relativ quantifiziert in Relation zum endogenen Kontrollgen (RNU6b) und unter Verwendung der Ct Methode in separaten Tubes. So zeigt der Vergleich der Ct-Werte, welche Probe der Patienten-Gruppen (HT-, MB-, Kontrollgruppe) mehr DNA vor der Amplifizierung enthielt und ermöglicht einen statistischen Vergleich der Gruppen. Um die Berechnung der relativen Genexpression der Proben bei der Durchführung der q-RT-PCR durchzuführen, wurde die Delta-Delta-Ct-Methode, auch bekannt als  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode angewendet.

## 2.5 Statistik

Alle erhobenen Daten wurden in Excel (2007, Microsoft, USA) tabellarisch angelegt und anschließend mit SPSS 20.0 (IBM, 2011) analysiert. Aufgrund der kleinen Gruppengrößen wurden Unterschiede zwischen den Mittelwerten der relativen miRNA Expression der Kontrollgruppe, der HT- sowie der MB-Gruppe mit den Mittelwerten des non-parametrischen Kruskal-Wallis-Test verglichen. Ergebnisse mit  $p < 0.05$  wurden als statistisch signifikant bewertet. Bonferroni-korrigierte Mann-Whitney-U-Tests wurden als Post-Hoc Test für den Fall durchgeführt, dass der Kruskal-Wallis-Test signifikant war, das heißt, dass das konventionell kritische alpha-niveau von 0.05 durch die Zahl der Post-Hoc Analysen geteilt wurde ( $0.05 / 2$ ) mit  $p < 0.025$  als signifikanten Post-Hoc Unterschied.  $\chi^2$  (RHO) (*fisher's exact*) Tests wurden verwendet um die verschiedenen Proportionen darzustellen. In  $\chi^2$ -Tests wurde  $p < 0.05$  als statistisch signifikant bewertet.

### 3. Ergebnisse

Insgesamt waren n=59 nicht miteinander verwandte Probanden an dieser Studie beteiligt. Von den n=59 Probanden waren 19 in der Kontrollgruppe, weitere 19 in der MB-Gruppe und 21 in der HT-Gruppe. Die 19 Probanden umfassende Kontrollgruppe ohne AITs hatten ein Durchschnittsalter von 42,25 Jahren, die Altersspanne reichte von 22 - 79 Jahren und bestand aus 12 weiblichen und 7 männlichen Probanden. Die Teilnehmer der ebenso starken MB-Gruppe (n=19) hatte ein Durchschnittsalter von 48 Jahren, die Altersspanne reichte von 20 - 83 Jahren und bestand aus 13 weiblichen und 6 männlichen Probanden. Die n=21 starke HT-Gruppe hatte ein Durchschnittsalter von 40 Jahren, die Altersspanne reichte von 12 - 67 Jahren und bestand aus 19 weiblichen und 2 männlichen Probanden. Eine Untersuchung bezogen auf das Patientenalter zeigte im Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Gruppenunterschiede,  $p=0,289$ . Die untersuchten miRNAs waren wie zuvor beschrieben:

- miRNA 34a\_1
- miRNA 143\_1
- miRNA 146a\_1
- miRNA 155\*\_1 und 155\_2
- miRNA 181a\*\_1 und 181b\_1
- miRNA 200a\_1 und 200a\_2\*

Zu Beginn wurde die durchschnittliche relative miRNA Expression in den PBMCs aller 3 Gruppen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass miRNA 146a\_1 statistisch signifikant erhöht in PBMCs von MB-Patienten gegenüber der Kontrolle ist. Wir fanden eine durchschnittliche relative Expression von 9,42 in MB-Patienten gegenüber 6,87 in der Kontrollgruppe,  $p=0,017$  (siehe Tabelle 8 und Tabelle 9).

miRNA in PBMCs	Kontrollgruppe		MB-Gruppe		HT-Gruppe		Kruskal-Wallis-Test
Anzahl Patienten	19		19		21		
	Durchschnitt	SD	Durchschnitt	SD	Durchschnitt	SD	p-Wert
34a_1	14.9845	2.51723	13.5299	1.46940	13.5659	3.14225	n.s.
143_1	15.9642	3.40512	15.8082	1.26454	16.2047	2.75941	n.s.
<b>146a_1</b>	<b>6.8714</b>	3.82770	<b>9.4228</b>	2.29542	9.0465	3.56513	<b>0.030</b>
<b>155*_1</b>	<b>17.4560</b>	4.77092	<b>18.4689</b>	0.90446	16.6119	2.26680	<b>0.021</b>
155_2	11.0771	1.47403	11.5542	1.58796	11.8492	1.40678	n.s.
181a*_1	14.8500	4.22941	15.4677	2.95393	15.6860	3.09205	n.s.
181b_1	8.6005	2.91385	9.4407	2.36097	8.3295	2.49579	n.s.
200a_1	15.1491	3.33402	15.4816	5.62126	15.6612	5.29238	n.s.
200a_2*	10.1294	7.00531	13.4610	2.82750	14.2450	2.76764	n.s.

**Tabelle 8: Durchschnittliche relative miRNA Expression in den PBMCs je Gruppe**

Anmerkung: Die fettgedruckten Mittelwerte unterscheiden sich signifikant.  
SD = Standardabweichung. n.s. = nicht signifikant.

miRNA in PBMCs	Kontrollgruppe vs. HT-Gruppe	Kontrollgruppe vs. MB-Gruppe	
	p-Wert	p-Wert	
<b>146a_1</b>	0.027	<b>0.017</b>	<b>MB &gt; Kontrollgruppe</b>
155*_1	0.047	0.872	n.s.

**Tabelle 9: Bonferroni-korrigierter Mann-Whitney-U-Test zur Post-Hoc-Analyse**

Anmerkung: Die fettgedruckten Werte sind bei einem Bonferroni-korrigierten p-Wert von 0,025 signifikant. n.s. = nicht signifikant.

Anschließend wurde die durchschnittliche relative miRNA Expression der CD4+ T-Zellen im peripheren Blut bei 10 MB, 10 HT und 10 Probanden der Kontrollgruppe untersucht. Folgende statistisch signifikante Änderungen des Expressionslevels von einigen miRNAs, verglichen mit der Kontrollgruppe, konnten festgestellt werden (siehe Tabelle 10 und Tabelle 11).

miRNA in CD4+	Kontrollgruppe		MB-Gruppe		HT-Gruppe		Kruskal-Wallis-Test
Anzahl Patienten	10		10		10		
	Durchschnitt	SD	Durchschnitt	SD	Durchschnitt	SD	p-Wert
34a_1	12.6734	1.8820	13.8120	2.4372	12.0646	4.1020	n.s
143_1	18.9467	1.0710	18.2813	2.4098	16.6490	4.2364	n.s
146a_1	7.8378	0.4216	8.1385	1.8992	5.8541	3.1389	n.s
<b>155*_1</b>	<b>15.9214</b>	1.2005	16.6349	1.5145	<b>13.5349</b>	3.2657	<b>0.0276</b>
155_2	10.5570	0.4059	10.6363	2.1738	10.0531	2.2689	n.s
181a*_1	11.9881	4.4635	16.9229	2.1391	14.9553	4.8634	n.s
181b_1	9.6901	0.5363	10.3465	2.1807	8.5635	3.8393	n.s
<b>200a_1</b>	<b>19.4026</b>	0.8500	<b>12.1005</b>	0.8669	<b>12.5701</b>	4.8645	<b>0.0001</b>
<b>200a_2*</b>	<b>17.9417</b>	2.2590	<b>13.3650</b>	0.88267	<b>12.6208</b>	1.6726	<b>0.0003</b>

**Tabelle 10: Durchschnittliche relative miRNA-Expression in CD4+ T-Zellen je Gruppe**

Anmerkung: Die fettgedruckten Mittelwerte unterscheiden sich signifikant.  
SD = Standardabweichung. n.s. = nicht signifikant

miRNA in CD4+	Kontrollgruppe vs. HT-Gruppe	Kontrollgruppe vs. MB-Gruppe	
	p-Wert	p-Wert	
155*_1	0.04937	0.70546	n.s.
<b>200a_1</b>	<b>0.00021</b>	<b>0.00016</b>	<b>Kontrollgruppe &gt; MB/HT</b>
<b>200a_2*</b>	<b>0.00038</b>	<b>0.00088</b>	<b>Kontrollgruppe &gt; MB/HT</b>

**Tabelle 11: Bonferroni-korrigierter Mann-Whitney-U-Test zur Post-Hoc-Analyse**

Anmerkung: Die fettgedruckten Werte sind bei einem Bonferroni-korrigierten p-Wert von 0,025 signifikant. n.s. = nicht signifikant

Im Weiteren wurde die relative miRNA-Expression in CD8+ T-Zellen im peripheren Blut in denselben Gruppen, wie zuvor schon bei den CD4+ T-Zellen, untersucht (siehe Tabelle 12 und Tabelle 13).

miRNA in CD8+	Kontrollgruppe		MB-Gruppe		HT-Gruppe		Kruskal-Wallis-Test
Anzahl Patienten	10		10		10		
	Durchschnitt	SD	Durchschnitt	SD	Durchschnitt	SD	p-Wert
miRNA 34a_1	12.7840	1.7684	13.3987	2.0206	12.6489	3.6591	n.s.
miRNA 143_1	17.3819	3.3645	17.6205	2.5990	16.7469	3.9380	n.s.
miRNA 146a_1	8.7585	1.3284	7.9438	1.9700	6.3416	3.2809	n.s.
<b>miRNA 155*_1</b>	<b>17.0667</b>	1.0473	16.3847	1.5057	<b>14.2522</b>	2.4194	<b>0.0040</b>
<b>miRNA 155_2</b>	<b>11.3007</b>	0.7141	<b>10.3945</b>	1.8811	<b>10.6874</b>	1.8109	<b>0.0069</b>
miRNA 181a*_1	13.2699	4.3064	16.3354	2.0049	14.6384	4.9741	n.s.
miRNA 181b_1	10.3096	1.8967	9.4823	1.9816	8.6013	3.4773	n.s.
<b>miRNA 200a_1</b>	<b>18.1190</b>	2.7510	<b>11.6572</b>	0.6286	<b>13.1275</b>	4.3749	<b>0.0011</b>
<b>miRNA 200a_2*</b>	<b>17.8437</b>	2.4541	<b>12.5372</b>	1.0043	<b>13.1028</b>	1.3013	<b>0.0002</b>

**Tabelle 12: Durchschnittliche relative miRNA-Expression in CD8+ T-Zellen je Gruppe**

Anmerkung: Die fettgedruckten Mittelwerte unterscheiden sich signifikant.  
SD = Standardabweichung. n.s. = nicht signifikant

miRNA in CD8+	Kontrollgruppe vs. HT-Gruppe	Kontrollgruppe vs. MB-Gruppe	
	p-Wert	p-Wert	
<b>155*_1</b>	<b>0.00650</b>	0.05878	<b>Kontrollgruppe &gt; HT</b>
<b>155_2</b>	<b>0.01017</b>	<b>0.00516</b>	<b>Kontrollgruppe &gt; MB/HT</b>
<b>200a_1</b>	<b>0.01911</b>	<b>0.00016</b>	<b>Kontrollgruppe &gt; MB/HT</b>
<b>200a_2*</b>	<b>0.00067</b>	<b>0.00051</b>	<b>Kontrollgruppe &gt; MB/HT</b>

**Tabelle 13: Bonferroni-korrigierter Mann-Whitney-U-Test zur Post-Hoc-Analyse**

Anmerkung: Die fettgedruckten Werte sind bei einem Bonferroni-korrigierten p-Wert von 0,025 signifikant.

Bei der HT-Gruppe konnte eine signifikant verringerte Expression der miRNA 155\*\_1 (14,25 in HT-Gruppe gegen 17,07 in der Kontrollgruppe, p=0,007), miRNA 155\_2 (10,69 in HT-Gruppe gegen 11,3 in der Kontrollgruppe, p=0,010), miRNA 200a\_1 (13,13 in HT-Gruppe gegen 18,12 in der Kontrollgruppe, p=0,02)

und miRNA 200a\_2\* (13,10 in HT-Gruppe gegen 17,84 in Kontrollgruppe  $p=0,0007$ ) verglichen mit der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die MB-Gruppe wies eine statistische Verringerung der Expression von miRNA 155\_2 (10,4 in MB-Gruppe gegen 11,3 in der Kontrollgruppe,  $p=0,005$ ), miRNA 200a\_1 (11,66 in MB-Gruppe gegen 18,12 in der Kontrollgruppe,  $p=0,0002$ ) und miRNA 200a\_2\* (12,54 in MB-Gruppe gegen 17,84 in der Kontrollgruppe,  $p=0,0005$ ), verglichen mit der Kontrollgruppe, auf. Keine signifikanten Änderungen fanden wir in der MB-Gruppe für miRNA 155\*\_1, wie zuvor in der HT-Gruppe.

In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss von Alter, Geschlecht, Autoantikörper-Titer (ANA-Titer), Dauer der Erkrankung und Behandlung auf diese miRNA-Expressionen untersucht. In Bezug auf das Alter wurden die 3 Gruppen in 3 weitere Untergruppen aufgeteilt: Alter unter 30, 31 - 60 und über 60 Jahren. Untereinander verglichen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede für miRNA 146a\_1 in den PBMCs herausgestellt werden (siehe Tabelle 14).

miRNA in PBMCs	<30j		30 - 60j		Kruskal-Wallis-Test	Mann-Whitney-U-Test
Anzahl Patienten	6		4			
	Durchschnitt	SD	Durchschnitt	SD	p-Wert	p-Wert
34a_1	16,6648	3,13361	16,5202	0,82593	n.s.	n.s.
143_1	16,3864	4,94139	18,8907	0,92619	n.s.	n.s.
146a_1	8,9837	2,64032	7,9780	4,05822	n.s.	n.s.
155*_1	14,7336	7,89697	20,2805	1,95682	0,033006	n.s.
155_2	11,7430	1,12491	11,7658	2,15793	n.s.	n.s.
181a*_1	17,9890	2,78250	18,1450	1,60275	n.s.	n.s.
181b_1	10,4751	2,93294	9,2331	2,67891	n.s.	n.s.
200a_1	12,3759	1,37301	12,9836	2,34208	n.s.	n.s.
200a_2*	9,9825	11,23793	16,2140	2,24532	n.s.	n.s.

**Tabelle 14: Durchschnittliche relative miRNA-Expression in PBMCs der Kontrollgruppe nach Alter**

Anmerkung: Die fettgedruckten Mittelwerte unterscheiden sich signifikant.  
SD = Standardabweichung. n.s. = nicht signifikant

Auch bei der Untersuchung der gefundenen regulierenden miRNAs in CD4+ und CD8+ T-Zellen konnten in den Untergruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede untereinander nachgewiesen werden (siehe Tabelle 15).

miRNA in CD8+	<30j		30 - 60j		>60j		Kruskal-Wallis-Test
	Durchschnitt	SD	Durchschnitt	SD	Durchschnitt	SD	
<b>Anzahl Patienten</b>	2		6		2		
	Durchschnitt	SD	Durchschnitt	SD	Durchschnitt	SD	p-Wert
<b>34a_1</b>	<b>12,6307</b>	0,04656	<b>14,0766</b>	2,43222	<b>12,1328</b>	0,14443	<b>0,030473</b>
143_1	17,6799	0,38688	17,7594	3,46601	17,1444	0,05210	n.s.
<b>146a_1</b>	<b>6,9181</b>	0,06727	<b>8,7247</b>	2,23269	<b>6,6269</b>	0,87525	<b>0,037903</b>
155*_1	15,4307	0,49397	16,8219	1,76484	15,7539	0,58151	n.s.
155_2	9,8393	0,13937	10,9522	2,31691	9,2765	0,07372	n.s.
181a*_1	15,2466	0,40465	16,9885	2,41073	15,4649	0,71444	n.s.
181b_1	8,6256	0,58165	9,9650	2,49566	8,8909	0,54451	n.s.
<b>200a_1</b>	10,8366	0,43487	12,0994	0,25372	11,1510	0,11460	<b>0,035891</b>
200a_2*	11,5486	0,14671	12,6321	1,04792	13,2412	0,75151	n.s.

**Tabelle 15: Durchschnittliche relative miRNA-Expression in CD8+ T-Zellen der MB-Gruppe nach Alter**

Anmerkung: Die fettgedruckten Mittelwerte unterscheiden sich signifikant.  
SD = Standardabweichung. n.s. = nicht signifikant

In Bezug auf das Geschlecht wurden die 3 Gruppen in die 2 Untergruppen, männlich und weiblich, aufgeteilt. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (siehe Tabelle 16 und Tabelle 17).

miRNA in PBMCs	Männlich		Weiblich		Kruskal-Wallis-Test	Mann-Whitney-U-Test
Anzahl Patienten	2		8			
	Durchschnitt	SD	Durchschnitt	SD	p-Wert	p-Wert
34a_1	13,6767	0,58642	11,8726	4,47144	n.s.	n.s.
143_1	15,9065	1,49802	14,5272	3,03806	n.s.	n.s.
<b>146a_1</b>	<b>11,2690</b>	0,02540	<b>6,7047</b>	4,01088	<b>0,036714</b>	n.s.
155*_1	17,5988	0,40242	15,7749	1,79421	n.s.	n.s.
155_2	11,8012	0,71835	11,7701	2,24250	n.s.	n.s.
181a*_1	17,2189	0,21112	14,2678	4,69812	n.s.	n.s.
181b_1	9,8905	0,49508	7,7766	3,85268	n.s.	n.s.
200a_1	9,9644	4,60973	11,0326	3,17129	n.s.	n.s.
200a_2*	16,8976	0,93453	16,3853	2,03596	n.s.	n.s.

**Tabelle 16: Durchschnittliche relative miRNA-Expression in PBMCs der AIT-Gruppe nach Geschlecht**

Anmerkung: Die fettgedruckten Mittelwerte unterscheiden sich signifikant.  
SD = Standardabweichung. n.s. = nicht signifikant

miRNA in CD4+	Männlich		Weiblich		Kruskal-Wallis-Test	Mann-Whitney-U-Test
Anzahl Patienten	5		5			
	Durchschnitt	SD	Durchschnitt	SD	p-Wert	p-Wert
34a_1	12,9867	0,94249	12,3601	2,61460	n.s.	n.s.
143_1	18,9885	1,26652	18,8419	0,86520	n.s.	n.s.
146a_1	7,7131	0,31627	7,9625	0,51097	n.s.	n.s.
155*_1	15,7688	1,46241	16,0740	1,02263	n.s.	n.s.
155_2	10,4801	0,50557	10,6339	0,31669	n.s.	n.s.
181a*_1	11,2532	4,80497	12,7230	4,51547	n.s.	n.s.
<b>181b_1</b>	<b>9,9393</b>	0,59843	<b>9,4409</b>	0,36568	<b>0,047202</b>	n.s.
200a_1	19,2936	0,70929	19,5116	1,04538	n.s.	n.s.
200a_2*	18,2375	2,83847	17,6459	1,79068	n.s.	n.s.

**Tabelle 17: Durchschnittliche relative miRNA-Expression in der CD4+ Kontrollgruppe nach Geschlecht**

Anmerkung: Die fettgedruckten Mittelwerte unterscheiden sich signifikant.  
SD = Standardabweichung. n.s. = nicht signifikant

Bezogen auf die Medikation und Schilddrüsenfunktion in der Kontrollgruppe zeigten alle 19 Patienten TSH (0,4-3,6 mU/l) und fT4 (0,8-1,8 ng/dl) Werte innerhalb der normalen Spanne ohne Thyreoidmedikation. 18 von 21 HT Probanden wurden mit L-Thyroxin behandelt und alle Patienten dieser Gruppe zeigten TSH und fT4 Level innerhalb des Normbereichs. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede an der miRNA-Expression gefunden, als Patienten mit und ohne L-Thyroxin Medikation miteinander verglichen wurden.

In der MB-Gruppe wurden alle Probanden mit den Thyreostatika Thiamazol oder Carbimazol behandelt. Auch hier konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede der miRNA-Expression festgestellt werden als in der MB-Gruppe euthyreote mit hyperthyreoten Patienten verglichen wurden. In Bezug auf die Dauer der Erkrankung, liegen für die HT-Gruppe auf Grund der langsamen Entwicklung der Erkrankung, keine exakten Daten für alle Patienten vor. Alle Patienten der

HT-Gruppe wurden mindestens für 6 Monate mit L-Thyroxin behandelt. In der MB-Gruppe wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede der miRNA Expression gefunden, als die Probanden in 2 Untergruppen eingeteilt wurden: Ausbruch der Krankheit vor mehr oder weniger als einem Jahr. Bezogen auf die Erkrankungsaktivität in der MB-Gruppe, wurden 3 Untergruppen definiert: TSH Rezeptor Antikörper Level unter 5 IU/l, 5-10 IU/l und über 10 IU/l. Auch in diesem Vergleich der Untergruppen miteinander konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (siehe Tabelle 18).

miRNA in CD4+	gering (0-4 IU/l)		mittel (5 - 10 IU/l)		schwer (>10 IU/l)		Kruskal-Wallis-Test
Anzahl Patienten	4		4		2		
	Durchschnitt	SD	Durchschnitt	SD	Durchschnitt	SD	p-Wert
34a_1	14,3672	2,35159	12,4336	0,63869	15,4038	4,70884	n.s.
143_1	18,3598	3,23437	17,3390	0,61876	18,9120	1,64012	n.s.
<b>146a_1</b>	<b>8,7572</b>	1,93143	<b>6,8326</b>	0,27696	<b>9,5129</b>	2,98539	<b>0,036384</b>
155*_1	17,1492	1,82197	15,7970	0,52928	17,2810	2,26805	n.s.
155_2	11,0959	2,62877	9,4893	0,38760	12,0110	3,38501	n.s.
181a*_1	17,3263	2,42927	15,7417	0,59943	18,4785	3,36607	n.s.
181b_1	10,6343	2,31596	9,1231	0,34824	12,2717	3,52370	n.s.
200a_1	12,7386	0,87227	11,4655	0,64163	12,0944	0,06368	n.s.
200a_2*	13,3748	0,20292	13,3860	1,19027	13,3034	1,62125	n.s.

**Tabelle 18: Durchschnittliche relative miRNA-Expression in CD4+ T-Zellen der MB-Gruppe durch Antikörperlast (TSH-R-AK)**

Anmerkung: Die fettgedruckten Mittelwerte unterscheiden sich signifikant.  
SD = Standardabweichung. n.s. = nicht signifikant

TSH MB-Gruppe:

alle n.s. n=10, davon **3** euthyreot, **7** hyperthyreot

FT4 MB-Gruppe:

alle n.s. n=10, davon **3** euthyreot, **5** latent hyperthyreot, **2** manifest hyperthyreot

Geschlecht MB-Gruppe:

alle n.s. n=10 davon **1** männlich, **9** weiblich

Alter HT-Gruppe:

alle n.s. n=10, davon **2** <30, **7** 30-60, **1** >60

## 4. Diskussion

Die genaue Ätiologie der Immunreaktion in MB und HT in der Schilddrüse ist weiterhin unbekannt. Die vorliegende Studie hatte das Ziel, den Einfluss ausgewählter miRNA die unter Verdacht stehen an der Immunregulation im Schilddrüsengewebe von Patienten, die unter AITs leiden, zu evaluieren. Es konnte dargelegt werden, dass die miRNA 146a\_1 signifikant erhöht in PBMCs von MB-Patienten gegenüber der Kontrollgruppe ist.

Analysen zu miRNA 146a Genexpressionen zeigen ein Induktionsmuster als Reaktion auf eine Reihe von mikrobiellen Komponenten und proinflammatorischen Zytokinen (Taganov et al., 2006). In humanen Lungenalveolarzellen wurde unter anderem gezeigt, dass sich eine erhöhte miRNA 146a Expression negativ auf die Regulierung der Freisetzung von proinflammatorischen Chemokinen IL-8 und RANTES auswirkt (Pauley et al., 2009; Perry et al., 2008). Bezüglich Autoimmunerkrankungen berichteten Nakasa et al., dass miRNA 146a höher exprimiert im synovialen Gewebe bei rheumatoider Arthritis ist, verglichen mit Osteoarthritis und normalem synovialen Gewebe. Wir konnten nun demonstrieren, dass miRNA 146a in PBMCs von MB-Patienten statistisch signifikant erhöht ist, entsprechend den Ergebnissen von Nakasa et al. (Nakasa et al., 2008). Dieses Ergebnis unterstreicht die Idee, dass MB durch eine Immigration mononuklearer Zellen, welche Th2 Zytokine produzieren, verursacht werden könnte. Durch die in der vorliegenden Arbeit abgeleiteten Daten kann die These aufgestellt werden, dass modifizierte PBMCs mit hochregulierter miRNA 146a das Schilddrüsengewebe von MB-Patienten infiltrieren und damit entscheidend involviert in der Zusammensetzung des lokalen Zytokinmilieu in MB sein könnten. Chen et al. konnten in ihrer Meta-Analyse keinen Zusammenhang zwischen dem miR-146a G/C rs2910164-Polymorphismus und der Entwicklung von AITs finden (Chen et al., 2013). Dies könnte darauf hindeuten, dass Autoimmunerkrankungen durch einen Anstieg von miRNA146a und nicht durch einen miRNA146a-Polymorphismus verursacht werden.

In einer vorhergehenden Studie konnte unsere Arbeitsgruppe zum ersten Mal eine signifikante Senkung von miRNA 155\_2 im Schilddrüsengewebe von HT-Patienten nachweisen (Bernecker et al., 2012). Im Jahr 2020 untersuchten Yilmaz et al. die Expressionswerte von miRNA 155 aus Blutproben von Patienten

mit HT. Ähnlich wie bei unserer Studie waren die miRNA 155 Expressionswerte in der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verringert (Yilmaz et al., 2021). Darüber hinaus konnte in unserer Studie aufgezeigt werden, dass beide Sequenzen der miRNA 155 (\*\_1 und \_2) signifikant erniedrigt in CD8+ T-Zellen von HT-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe sind. Gleiches gilt für miRNA 155\_2, welche signifikant erniedrigt in CD8+ T-Zellen von MB-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe sind. Bezüglich miRNA 155 haben Thai et al. aufgezeigt, dass miRNA 155 eine wichtige Rolle im Immunsystem von Säugern bei der spezifischen Regulation der T-Helfer-Zell-Differenzierung und Keimzellreaktion spielen, um eine optimale T-Zell abhängige Antikörperantwort zu erzeugen (Thai et al., 2007). Auf Basis dieser Vorarbeit haben wir miRNA 155 als passenden Kandidaten für die miRNA Regulation bzw. Regulation in AITs herangezogen.

Wie zuvor erwähnt, konnte in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt werden, dass miRNA 155\*\_1 und \_2 signifikant erniedrigt in CD8+ T-Zellen im peripheren Blut von HT-Patienten sind. Wie bei HT aufgezeigt, werden CD8+ T-Zellen aktiviert und infiltrieren in die Schilddrüse (Ehlers et al., 2012; Rodriguez et al., 2007). Wir vermuten, dass die genetisch modifizierten CD8+ T-Zellen in die Schilddrüse infiltrieren und nehmen an, dass die posttranskriptionelle Regulation, verursacht durch die Erniedrigung von miRNA 155 in zytotoxischen CD8+ T-Zellen, zur pathologischen Identifikation von schilddrüsenspezifischen zellulären Antigenen TPO und Tg durch CD8+ T-Zellen beiträgt und zusätzlich an der Zerstörung der Schilddrüse involviert ist. Diese genannten Annahmen bedürfen weiterer Untersuchung.

Wir fanden außerdem eine Erniedrigung von miRNA 155\_2 in zytotoxischen CD8+ T-Zellen bei MB-Patienten im peripheren Blut. Auch wenn zunehmend klar wird, dass CD8+ T-Zellen, aktiviert durch autoreaktive B-Zellen, zur toxischen Reaktion im Schilddrüsengewebe bei MB-Patienten beitragen (Slowik et al., 2012), bleibt der genaue Mechanismus der Aktivierung unklar. Man geht davon aus, dass die Aktivierung durch eine komplizierte Interaktion von Chemokinen und Zytokinen verursacht wird. Im Zusammenhang mit den hier vorliegenden Ergebnissen, lässt sich folgende interessante These aufstellen: Könnten die identifizierten Chemo- und Zytokine in MB Einfluss auf den Level von miRNA 155 in MB haben, was zu post-transkriptioneller Regulation von CD8+ T-Zellen führt?

Vergangene groß angelegte Genomweite Assoziationsstudien (GWA) von Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) Variationen, erfassten viele Tausend individuelle genetische Profile von *Homo Sapiens* und erleichterten die Identifikation von signifikanten genetischen Eigenschaften, welche höchst wahrscheinlich die Pathogenese einiger großer Erkrankungen beeinflussen. Glinsky analysierte zum ersten Mal Genexpressionsmuster von miRNAs in Zusammenhang mit AITs (Burton et al., 2007; Glinsky, 2008). Er konnte aufzeigen, dass mehrere miRNAs, inklusive miRNA 200, mit AITs im Allgemeinen verknüpft sind und mit MB insbesondere. Zuvor wurde die miRNA 200 Familie mit der Entwicklung und Proliferation von verschiedenen Typen von Krebs verknüpft (Glinsky, 2008; Hung et al., 2013; Soubani et al., 2012). Des Weiteren konnte in der vorliegenden Studie eine Erniedrigung von miRNA 200a\_1 und 200a2\* in CD4+ und CD8+ T-Zellen im peripheren Blut, aber nicht in PBMCs von MB- und HT-Patienten, erkannt werden. Wir glauben, dass diese entgegengesetzten Ergebnisse in peripheren Blutzellen und Schilddrüsengewebe eventuell durch die Involvierung von verschiedenen Zellen verursacht wird. Die Senkung von miRNA 200a in peripheren CD4+ T-Zellen von HT-Patienten könnte möglicherweise zu einer Erhöhung von proinflammatorischen Th1 Zytokinen führen, welche Schilddrüsenzellen schädigen, die wiederum die Produktion von miRNA 200a erhöhen. Die Senkung von miRNA 200a in CD8+ T-Zellen könnte zur pathologischen Erkennung von schilddrüsen-spezifischen zellulären Antigenen, wie z.B. TPO und Tg beitragen und schließlich in eine Zerstörung der Schilddrüse durch CD8+ T-Zellen führen (Ehlers et al., 2012). Die Erniedrigung von miRNA 200a in CD4+ T-Zellen von MB-Patienten könnte auch eine Ursache für die Erhöhung von proinflammatorischen Th1 sein und auf diesem Wege zur Erkrankung beitragen.

Die weiteren untersuchten miRNAs zeigten in den Untersuchungen keine signifikanten Veränderungen der verschiedenen AITs, auch wenn Hinweise für Ihre Beteiligung an der Immunregulation existieren.

In den 3 Gruppen (MB, HT, Kontrollgruppe) wurden keine signifikanten Unterschiede bezogen auf das Durchschnittsalter gefunden. In der HT-Gruppe waren Frauen überrepräsentiert. Dies spiegelt die 8-10 Mal höhere Anfälligkeit von Frauen für diese Erkrankung wider (Feldkamp, 2009). Es gibt jedoch derweil

keine Daten, die den Einfluss des Geschlechts auf die Expression der miRNAs beschreibt.

In den weiteren Untergruppenanalysen fanden wir keinen signifikanten Einfluss des Geschlechts, Alters, Medikation, Schilddrüsenfunktion, Dauer und Erkrankungsaktivität auf die miRNAs. Trotzdem gilt diese Analyse auf Grund der limitierten Anzahl von Patienten als vorläufig. Liu et al. konnten aufzeigen, dass die miRNA Expression in PBMCs durch die Schilddrüsenfunktion beeinflusst wird (Liu et al., 2012). Auch wenn Liu et al. nicht die Regulation von CD4+ und CD8+ T-Zellen untersucht haben, so könnten sie dennoch von Belang sein. Dies könnte besonders wichtig für die MB-Gruppe sein, da viele Patienten hier hyperthyreot waren. Weiterführende Studien sollten folgen, um herauszufinden, ob Änderungen in der miRNA Expression die Ursache oder die Folge von AITs darstellen.

## 5. Schlussfolgerung

MB und HT sind Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse, dessen genaue Ätiologie noch nicht bekannt ist. miRNAs, welchen regulierende Funktionen in der Genexpression zugesprochen werden, stehen unter Verdacht Einfluss auf autoimmunologische Prozesse zu haben. Ziel der vorliegenden Studie war es, einen Zusammenhang zwischen miRNAs und AITs zu untersuchen. Es konnte *in vivo* gezeigt werden, dass die miRNAs 146a1, 200a1 und 155 in PBMCs, CD4+ und CD8+ T-Zellen von Patienten, welche unter MB und HT leiden, vermutlich eine beeinflussende Rolle spielen. Diese Daten könnten zu einem besseren Verständnis der Ursache von Autoimmunprozessen, welche zu AITs führen, beitragen. In den verursachenden Zellen konnten signifikante Hoch- bzw. Runter-Regulationen von miRNAs erkannt werden, welche verantwortlich für posttranskriptionelle Genregulation in den verursachten Zellen zu sein scheinen. Weiterfolgende Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die Relevanz dieser Erkenntnisse in AITs sinnvoll nachzuvollziehen.

## 6. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Adamson, L.A., Fowler, L.J., Clare-Salzler, M.J., Hobbs, J.A., 2011. Parvovirus B19 infection in Hashimoto's thyroiditis, papillary thyroid carcinoma, and anaplastic thyroid carcinoma. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association* 21, 1–7.
- Allelein, S., Schott, M., 2019. Update Morbus Basedow. *Dtsch med Wochenschr* 144, 152–155.
- Andersen, M.H., Schrama, D., Straten, P.T., Becker, J.C., 2006. Cytotoxic T cells. *Journal of Investigative Dermatology* 126, 32–41.
- Anderton, S.M., Wraith, D.C., 2002. Selection and fine-tuning of the autoimmune T-cell repertoire. *Nature Reviews Immunology* 2, 487–498.
- Armengol, M.P., Juan, M., Lucas-Martin, A., Fernandez-Figueras, M.T., Jaraquemada, D., Gallart, T., Pujol-Borrell, R., 2001. Thyroid Autoimmune Disease. *Am J Pathol* 159, 861–873.
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.
- Basedow, C.A. v., 1840. Exopthalmus durch Hypertrophie des Zellgewebes in der Augenhöhle, 6:197–204. *Wochenschr Heilkd.*
- Becks, G.P., Burrow, G.N., 1991. Thyroid disease and pregnancy. *Medical Clinics of North America* 75, 121–150.
- Bensenor, I.M., Olmos, R.D., Lotufo, P.A., 2012. Hypothyroidism in the elderly: diagnosis and management. *Clinical Interventions in Aging* 7, 97–111.
- Bernecker, C., Lenz, L., Ostapczuk, M.S., Schinner, S., Willenberg, H., Ehlers, M., Vordenbäumen, S., Feldkamp, J., Schott, M., 2012. MicroRNAs miR-146a1, miR-155\_2, and miR-200a1 are regulated in autoimmune thyroid diseases. *Thyroid* 22, 1294–1295.
- Bliddal, S., Nielsen, C.H., Feldt-Rasmussen, U., 2017. Recent advances in understanding autoimmune thyroid disease: the tallest tree in the forest of polyautoimmunity. *F1000Res* 6, 1776.
- Boelaert, K., Newby, P.R., Simmonds, M.J., Holder, R.L., Carr-Smith, J.D., Heward, J.M., Manji, N., Allahabadia, A., Armitage, M., Chatterjee, K.V., Lazarus, J.H., Pearce, S.H., Vaidya, B., Gough, S.C., Franklyn, J.A., 2010.

- Prevalence and relative risk of other autoimmune diseases in subjects with autoimmune thyroid disease. *Am J Med* 123, 183.e1–9.
- Brent, G.A., 2008. Graves' Disease. *N Engl J Med* 358, 2594–2605.
- Brown, R.S., 2009. Autoimmune thyroid disease: unlocking a complex puzzle. *Current Opinion in Pediatrics* 21, 523–528.
- Burton, P.R., Clayton, D.G., Cardon, L.R., Craddock, N., Deloukas, P., Duncanson, A., Kwiatkowski, D.P., McCarthy, M.I., Ouwehand, W.H., Samani, N.J., Todd, J.A., Donnelly, P., Barrett, J.C., Davison, D., Easton, D., Evans, D., Leung, H.-T., Marchini, J.L., Morris, A.P., Spencer, C.C.A., Tobin, M.D., Attwood, A.P., Boorman, J.P., Cant, B., Everson, U., Hussey, J.M., Jolley, J.D., Knight, A.S., Koch, K., Meech, E., Nutland, S., Prowse, C.V., Stevens, H.E., Taylor, N.C., Walters, G.R., Walker, N.M., Watkins, N.A., Winzer, T., Jones, R.W., McArdle, W.L., Ring, S.M., Strachan, D.P., Pembrey, M., Breen, G., Clair, D.S., Caesar, S., Gordon-Smith, K., Jones, L., Fraser, C., Green, E.K., Grozeva, D., Hamshere, M.L., Holmans, P.A., Jones, I.R., Kirov, G., Moskvina, V., Nikolov, I., O'Donovan, M.C., Owen, M.J., Collier, D.A., Elkin, A., Farmer, A., Williamson, R., McGuffin, P., Young, A.H., Ferrier, I.N., Ball, S.G., Balmforth, A.J., Barrett, J.H., Bishop, D.T., Iles, M.M., Maqbool, A., Yuldasheva, N., Hall, A.S., Braund, P.S., Dixon, R.J., Mangino, M., Stevens, S., Thompson, J.R., Bredin, F., Tremelling, M., Parkes, M., Drummond, H., Lees, C.W., Nimmo, E.R., Satsangi, J., Fisher, S.A., Forbes, A., Lewis, C.M., Onnie, C.M., Prescott, N.J., Sanderson, J., Mathew, C.G., Barbour, J., Mohiuddin, M.K., Todhunter, C.E., Mansfield, J.C., Ahmad, T., Cummings, F.R., Jewell, D.P., Webster, J., Brown, M.J., Lathrop, G.M., Connell, J., Dominiczak, A., Marcano, C.A.B., Burke, B., Dobson, R., Gungadoo, J., Lee, K.L., Munroe, P.B., Newhouse, S.J., Onipinla, A., Wallace, C., Xue, M., Caulfield, M., Farrall, M., Barton, A., (braggs), T.B. in R.G. and G., Bruce, I.N., Donovan, H., Eyre, S., Gilbert, P.D., Hider, S.L., Hinks, A.M., John, S.L., Potter, C., Silman, A.J., Symmons, D.P.M., Thomson, W., Worthington, J., Dunger, D.B., Widmer, B., Frayling, T.M., Freathy, R.M., Lango, H., Perry, J.R.B., Shields, B.M., Weedon, M.N., Hattersley, A.T., Hitman, G.A., Walker, M., Elliott, K.S., Groves, C.J., Lindgren, C.M., Rayner, N.W., Timpson, N.J.,

- Zeggini, E., Newport, M., Sirugo, G., Lyons, E., Vannberg, F., Hill, A.V.S., Bradbury, L.A., Farrar, C., Pointon, J.J., Wordsworth, P., Brown, M.A., Franklyn, J.A., Heward, J.M., Simmonds, M.J., Gough, S.C.L., Seal, S., (uk), B.C.S.C., Stratton, M.R., Rahman, N., Ban, M., Goris, A., Sawcer, S.J., Compston, Alastair, Conway, D., Jallow, M., Rockett, K.A., Bumpstead, S.J., Chaney, A., Downes, K., Ghori, M.J.R., Gwilliam, R., Hunt, S.E., Inouye, M., Keniry, A., King, E., McGinnis, R., Potter, S., Ravindrarajah, R., Whittaker, P., Widdon, C., Withers, D., Cardin, N.J., Ferreira, T., Pereira-Gale, J., Hallgrimsdóttir, I.B., Howie, B.N., Su, Z., Teo, Y.Y., Vukcevic, D., Bentley, D., Compston, Alistair, 2007. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447, 661–678.
- Chen, C.-Z., Li, L., Lodish, H.F., Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303, 83–86.
- Chen, H.F., Hu, T.T., Zheng, X.Y., Li, M.Q., Luo, M.H., Yao, Y.X., Chen, Q., Yu, S.Y., 2013. Association between miR-146a rs2910164 polymorphism and autoimmune diseases susceptibility: A meta-analysis. *Gene* 521, 259–264.
- Chong, M.M.W., Rasmussen, J.P., Rudensky, A.Y., Littman, D.R., 2008. The RNaseIII enzyme Droscha is critical in T cells for preventing lethal inflammatory disease. *J Exp Med* 205, 2005–2017.
- Croce, C.M., Calin, G.A., 2005. miRNAs, Cancer, and Stem Cell Division. *Cell* 122, 6–7.
- DeGroot, L.J., Quintans, J., 1989. The causes of autoimmune thyroid disease. *Endocr Rev* 10, 537–562.
- Dobrzanski, M.J., Reome, J.B., Hollenbaugh, J.A., Dutton, R.W., 2004. Tc1 and Tc2 effector cell therapy elicit long-term tumor immunity by contrasting mechanisms that result in complementary endogenous type 1 antitumor responses. *Journal of Immunology* 172, 1380–1390.
- Dong, Y.H., Fu, D.G., 2014. Autoimmune thyroid disease: mechanism, genetics and current knowledge. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 18, 3611–3618.
- Duntas, L.H., 2008. Environmental factors and autoimmune thyroiditis. *Nat Rev Endocrinol* 4, 454–460.

- Ehlers, M., Thiel, A., Bernecker, C., Porwol, D., Papewalis, C., Willenberg, H.S., Schinner, S., Hautzel, H., Scherbaum, W.A., Schott, M., 2012. Evidence of a Combined Cytotoxic Thyroglobulin and Thyroperoxidase Epitope-Specific Cellular Immunity in Hashimoto's Thyroiditis. *JCEM* 97, 1347–1354.
- Feldkamp, J., 2009. Autoimmunthyreoiditis: Diagnostik und Therapie. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift* 134, 2504–2509.
- Fink, H., Hintze, G., 2010. [Autoimmune thyroiditis (Hashimoto's thyroiditis): current diagnostics and therapy]. *Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin (Munich)* 105, 485–493.
- Frank, C.U., Braeth, S., Dietrich, J.W., Wanjura, D., Loos, U., 2015. Bridge Technology with TSH Receptor Chimera for Sensitive Direct Detection of TSH Receptor Antibodies Causing Graves' Disease: Analytical and Clinical Evaluation. *Horm Metab Res* 47, 880–888.
- Gaitonde, D.Y., Rowley, K.D., Sweeney, L.B., 2012. Hypothyroidism: an update. *American Family Physician* 86, 244–251.
- Gangaraju, V.K., Lin, H., 2009. MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 116–125.
- Glinsky, G.V., 2008. Phenotype-defining functions of multiple non-coding RNA pathways. *Cell Cycle* 7, 1630–1639.
- Graves, R.J., 1835. Newly Observed Affection of the Thyroid Gland in Females, *London Medical and Surgical Journal. Clinical Lectures*.
- Greenfield, E.A., Nguyen, K.A., Kuchroo, V.K., 1998. CD28/B7 costimulation: a review. *Critical Reviews in Immunology* 18, 389–418.
- Gressner, A.M., Arndt, T., 2019. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, 3. ed. Springer.
- Gutzmer, R., Koop, A., Meier, F., Hassel, J.C., Terheyden, P., Zimmer, L., Heinzerling, L., Ugurel, S., Pföhler, C., Gesierich, A., Livingstone, E., Satzger, I., Kähler, K.C., German Dermatocology Group (DeCOG), 2017. Programmed cell death protein-1 (PD-1) inhibitor therapy in patients with advanced melanoma and preexisting autoimmunity or ipilimumab-triggered autoimmunity. *Eur J Cancer* 75, 24–32.
- Hadj-Kacem, H., Rebuffat, S., Mnif-Féki, M., Belguith-Maalej, S., Ayadi, H., Péraldi-Roux, S., 2009. Autoimmune thyroid diseases: genetic

- susceptibility of thyroid-specific genes and thyroid autoantigens contributions. *Int. J. Immunogenet.* 36, 85–96.
- Harfe, B.D., McManus, M.T., Mansfield, J.H., Hornstein, E., Tabin, C.J., 2005. The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb. *PNAS* 102, 10898–10903.
- Hashimoto, H., 1912. Zur Kenntnis der lymphomatösen Veränderung der Schilddrüse (Struma. *Archiv für klinische Chirurgie* 97, 219.
- He, L., Hannon, G.J., 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5, 522–531.
- Heinzerling, L., de Toni, E.N., Schett, G., Hundorfean, G., Zimmer, L., 2019. Checkpoint Inhibitors. *Dtsch Arztebl Int* 116, 119–126.
- Herold, G., 2022. *Innere Medizin: eine vorlesungsorientierte Darstellung: 2022: unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung, mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis.* Gerd Herold, Köln.
- Hidaka, Y., Amino, N., Iwatani, Y., Kaneda, T., Nasu, M., Mitsuda, N., Tanizawa, O., Miyai, K., 1992. Increase in peripheral natural killer cell activity in patients with autoimmune thyroid disease. *Autoimmunity* 11, 239–246.
- Hollowell, J.G., Staehling, N.W., Flanders, W.D., Hannon, W.H., Gunter, E.W., Spencer, C.A., Braverman, L.E., 2002. Serum TSH, T4, and Thyroid Antibodies in the United States Population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *JCEM* 87, 489–499.
- Hotze, L.-A., Schumm-Draeger, P.-M., Pfannenstiel, P., 2003. *Schilddrüsenerkrankungen: Diagnose und Therapie*, 5., erw. u. vollst. überarb. Aufl. ed. BMV, Berliner Medizinische-Verlagsanst, Berlin.
- Huber, G., Staub, J.-J., Meier, C., Mittrache, C., Guglielmetti, M., Huber, P., Braverman, L.E., 2002. Prospective study of the spontaneous course of subclinical hypothyroidism: prognostic value of thyrotropin, thyroid reserve, and thyroid antibodies. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87, 3221–3226.
- Hung, C.-S., Liu, H.-H., Liu, J.-J., Yeh, C.-T., Chang, T.-C., Wu, C.-H., Ho, Y.-S., Wei, P.-L., Chang, Y.-J., 2013. MicroRNA-200a and -200b Mediated

- Hepatocellular Carcinoma Cell Migration Through the Epithelial to Mesenchymal Transition Markers. *Ann Surg Oncol* 1–9.
- Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., Sakaguchi, S., 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.* 162, 5317–5326.
- Jacobson, E.M., Tomer, Y., 2007. The genetic basis of thyroid autoimmunity. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association* 17, 949–961.
- Johnson, D.B., Sullivan, R.J., Ott, P.A., Carlino, M.S., Khushalani, N.I., Ye, F., Guminski, A., Puzanov, I., Lawrence, D.P., Buchbinder, E.I., Mudigonda, T., Spencer, K., Bender, C., Lee, J., Kaufman, H.L., Menzies, A.M., Hassel, J.C., Mehnert, J.M., Sosman, J.A., Long, G.V., Clark, J.I., 2016. Ipilimumab Therapy in Patients With Advanced Melanoma and Preexisting Autoimmune Disorders. *JAMA Oncol* 2, 234–240.
- Jørgensen, K.T., Rostgaard, K., Bache, I., Biggar, R.J., Nielsen, N.M., Tommerup, N., Frisch, M., 2010. Autoimmune diseases in women with Turner's Syndrome. *Arthritis & Rheumatism* 62, 658–666.
- Kahaly, G.J., Bartalena, L., Hegedüs, L., Leenhardt, L., Poppe, K., Pearce, S.H., 2018. 2018 European Thyroid Association Guideline for the Management of Graves' Hyperthyroidism. *Eur Thyroid J* 7, 167–186.
- Kanellopoulou, C., Muljo, S.A., Kung, A.L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D.M., Rajewsky, K., 2005. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev.* 19, 489–501.
- Kilgore, N.E., Ford, M.L., Margot, C.D., Jones, D.S., Reichardt, P., Evavold, B.D., 2004. Defining the parameters necessary for T-cell recognition of ligands that vary in potency. *Journal of Immunology Research* 29, 29–40.
- Kim, K.-S., Kim, J.S., Lee, M.R., Jeong, H.S., Kim, J., 2009. A study of microRNAs in silico and in vivo: emerging regulators of embryonic stem cells. *FEBS Journal* 276, 2140–2149.
- Kleinau, G., Mueller, S., Jaeschke, H., Grzesik, P., Neumann, S., Diehl, A., Paschke, R., Krause, G., 2011. Defining structural and functional

- dimensions of the extracellular thyrotropin receptor region. *J Biol Chem* 286, 22622–22631.
- Koralov, S.B., Muljo, S.A., Galler, G.R., Krek, A., Chakraborty, T., Kanellopoulou, C., Jensen, K., Cobb, B.S., Merckenschlager, M., Rajewsky, N., Rajewsky, K., 2008. Dicer Ablation Affects Antibody Diversity and Cell Survival in the B Lymphocyte Lineage. *Cell* 132, 860–874.
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., Griffiths-Jones, S., 2019. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research* 47, D155–D162.
- Krohn, K., Führer, D., Bayer, Y., Eszlinger, M., Brauer, V., Neumann, S., Paschke, R., 2005. Molecular pathogenesis of euthyroid and toxic multinodular goiter. *Endocrine reviews* 26, 504–524.
- Lee, H., Hodi, F.S., Giobbie-Hurder, A., Ott, P.A., Buchbinder, E.I., Haq, R., Tolaney, S., Barroso-Sousa, R., Zhang, K., Donahue, H., Davis, M., Gargano, M.E., Kelley, K.M., Carroll, R.S., Kaiser, U.B., Min, L., 2017. Characterization of Thyroid Disorders in Patients Receiving Immune Checkpoint Inhibition Therapy. *Cancer Immunol Res* 5, 1133–1140.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
- Lehmann, H.W., Lutterbüse, N., Plentz, A., Akkurt, I., Albers, N., Hauffa, B.P., Hiort, O., Schoenau, E., Modrow, S., 2008. Association of parvovirus B19 infection and Hashimoto's thyroiditis in children. *Viral Immunol* 21, 379–384.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20.
- Li, Q.-J., Chau, J., Ebert, P.J.R., Sylvester, G., Min, H., Liu, G., Braich, R., Manoharan, M., Soutschek, J., Skare, P., Klein, L.O., Davis, M.M., Chen, C.-Z., 2007. miR-181a Is an Intrinsic Modulator of T Cell Sensitivity and Selection. *Cell* 129, 147–161.
- Li, Y., Teng, D., Shan, Z., Teng, X., Guan, H., Yu, X., Fan, C., Chong, W., Yang, F., Dai, H., Gu, X., Yu, Y., Mao, J., Zhao, D., Li, J., Chen, Y.,

- Yang, R., Li, C., Teng, W., 2008. Antithyroperoxidase and antithyroglobulin antibodies in a five-year follow-up survey of populations with different iodine intakes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93, 1751–1757.
- Liu, R., Ma, X., Xu, L., Wang, D., Jiang, X., Zhu, W., Cui, B., Ning, G., Lin, D., Wang, S., 2012. Differential MicroRNA Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Graves' Disease Patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 97, E968–E972.
- Lorini, R., Gastaldi, R., Traggiai, C., Perucchin, P.P., 2003. Hashimoto's Thyroiditis. *Pediatric Endocrinology Reviews, Discussion* 211 1, 205–211.
- Manji, N., Carr-Smith, J.D., Boelaert, K., Allahabadia, A., Armitage, M., Chatterjee, V.K., Lazarus, J.H., Pearce, S.H.S., Vaidya, B., Gough, S.C., Franklyn, J.A., 2006. Influences of age, gender, smoking, and family history on autoimmune thyroid disease phenotype. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91, 4873–4880.
- Mason, D., 1998. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunology Today* 19, 395–404.
- McLachlan, S.M., Rapoport, B., 2004. Autoimmune hypothyroidism: T cells caught in the act. *Nature Medicine* 10, 895–896.
- Menzies, A.M., Johnson, D.B., Ramanujam, S., Atkinson, V.G., Wong, A.N.M., Park, J.J., McQuade, J.L., Shoushtari, A.N., Tsai, K.K., Eroglu, Z., Klein, O., Hassel, J.C., Sosman, J.A., Guminski, A., Sullivan, R.J., Ribas, A., Carlino, M.S., Davies, M.A., Sandhu, S.K., Long, G.V., 2017. Anti-PD-1 therapy in patients with advanced melanoma and preexisting autoimmune disorders or major toxicity with ipilimumab. *Ann Oncol* 28, 368–376.
- Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., Radbruch, A., 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry Part A* 11, 231–238.
- Moffatt, S., Tanaka, N., Tada, K., Nose, M., Nakamura, M., Muraoka, O., Hirano, T., Sugamura, K., 1996. A cytotoxic nonstructural protein, NS1, of human parvovirus B19 induces activation of interleukin-6 gene expression. *Journal of Virology* 70, 8485–8491.

- Mori, K., Yoshida, K., 2010. Viral infection in induction of Hashimoto's thyroiditis: a key player or just a bystander? *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 17, 418–424.
- Moss, P.A., Rosenberg, W.M., Bell, J.I., 1992. The human T cell receptor in health and disease. *Annual Review of Immunology* 10, 71–96.
- Nakasa, T., Miyaki, S., Okubo, A., Hashimoto, M., Nishida, K., Ochi, M., Asahara, H., 2008. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum* 58, 1284–1292.
- Nanba, T., Watanabe, M., Inoue, N., Iwatani, Y., 2009. Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto's disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Graves' disease. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association* 19, 495–501.
- Neilson, J.R., Zheng, G.X.Y., Burge, C.B., Sharp, P.A., 2007. Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes Dev.* 21, 578–589.
- Ng, H.P., Kung, A.W.C., 2006. Induction of autoimmune thyroiditis and hypothyroidism by immunization of immunoactive T cell epitope of thyroid peroxidase. *Endocrinology* 147, 3085–3092.
- Nielsen, C.H., Brix, T.H., Gardas, A., Banga, J.P., Hegedüs, L., 2008. Epitope recognition patterns of thyroid peroxidase autoantibodies in healthy individuals and patients with Hashimoto's thyroiditis\*. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 69, 664–668.
- O'Carroll, D., Mecklenbrauker, I., Das, P.P., Santana, A., Koenig, U., Enright, A.J., Miska, E.A., Tarakhovskiy, A., 2007. A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway. *Genes Dev.* 21, 1999–2004.
- Paknys, G., Kondrotas, A.J., Kevelaitis, E., 2009. [Risk factors and pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis]. *Medicina (Kaunas)* 45, 574–583.
- Pauley, K.M., Cha, S., Chan, E.K.L., 2009. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* 32, 189–194.
- Pearce, E.N., Farwell, A.P., Braverman, L.E., 2003. Thyroiditis. *N. Engl. J. Med.* 348, 2646–2655.

- Perros, P., Hegedüs, L., Bartalena, L., Marcocci, C., Kahaly, G.J., Baldeschi, L., Salvi, M., Lazarus, J.H., Eckstein, A., Pitz, S., Boboridis, K., Anagnostis, P., Ayvaz, G., Boschi, A., Brix, T.H., Currò, N., Konuk, O., Marinò, M., Mitchell, A.L., Stankovic, B., Törüner, F.B., von Arx, G., Zarković, M., Wiersinga, W.M., 2017. Graves' orbitopathy as a rare disease in Europe: a European Group on Graves' Orbitopathy (EUGOGO) position statement. *Orphanet J Rare Dis* 12, 72.
- Perry, M.M., Moschos, S.A., Williams, A.E., Shepherd, N.J., Lerner-Svensson, H.M., Lindsay, M.A., 2008. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J. Immunol.* 180, 5689–5698.
- Qiagen, 2011. miScript PCR System Handbook [WWW Document]. URL <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=7954ef25-3a39-4b0a-a27e-42689dbb4f5f&lang=en> (accessed 3.1.23).
- Qiagen, 2020. miRNeasy Mini Handbook [WWW Document]. URL <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=da6c8d17-58c4-411c-a334-bc1754876db3&lang=en> (accessed 3.1.23).
- Qiagen, 2022. PAXgene Blood RNA Kit (Handbuch) [WWW Document]. URL <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=c059c062-1468-44d3-9228-0451993e9141&lang=de-DE> (accessed 3.1.23).
- Quarantino, S., Badami, E., Pang, Y.Y., Bartok, I., Dyson, J., Kioussis, D., Londei, M., Maiuri, L., 2004. Degenerate self-reactive human T-cell receptor causes spontaneous autoimmune disease in mice. *Nature Medicine* 10, 920–926.
- Quarantino, S., Thorpe, C.J., Travers, P.J., Londei, M., 1995. Similar antigenic surfaces, rather than sequence homology, dictate T-cell epitope molecular mimicry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 10398–10402.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G., 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901–906.
- Rodriguez, A., Vigorito, E., Clare, S., Warren, M.V., Couttet, P., Soond, D.R., van Dongen, S., Grocock, R.J., Das, P.P., Miska, E.A., Vetrie, D.,

- Okkenhaug, K., Enright, A.J., Dougan, G., Turner, M., Bradley, A., 2007. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316, 608–611.
- Rose, N.R., Bonita, R., Burek, C.L., 2002. Iodine: an environmental trigger of thyroiditis. *Autoimmunity Reviews* 1, 97–103.
- Ruvkun, G., 2001. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* (New York, N.Y.) 294, 797–799.
- Schott, M., Feldkamp, J., Bathan, C., Fritzen, R., Scherbaum, W.A., Seissler, J., 2000. Detecting TSH-Receptor Antibodies with the Recombinant TBII Assay: Technical and Clinical Evaluation. *Horm Metab Res* 32, 429–435.
- Schott, M., Scherbaum, W.A., 2006. Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen. *Deutsches Ärzteblatt* 103, 3023–3032.
- Slowik, M., Urbaniak-Kujda, D., Bohdanowicz-Pawlak, A., Kapelko-Slowik, K., Dybko, J., Wolowiec, D., Jazwiec, B., Daroszewski, J., 2012. CD8+CD28-lymphocytes in peripheral blood and serum concentrations of soluble interleukin 6 receptor are increased in patients with Graves' orbitopathy and correlate with disease activity. *Endocr. Res.* 37, 89–95.
- Soubani, O., Ali, A.S., Logna, F., Ali, S., Philip, P.A., Sarkar, F.H., 2012. Re-expression of miR-200 by novel approaches regulates the expression of PTEN and MT1-MMP in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 33, 1563–1571.
- Spain, L., Diem, S., Larkin, J., 2016. Management of toxicities of immune checkpoint inhibitors. *Cancer Treatment Reviews* 44, 51–60.
- Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.-J., Baltimore, D., 2006. NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 12481–12486.
- Thai, T.-H., Calado, D.P., Casola, S., Ansel, K.M., Xiao, C., Xue, Y., Murphy, A., Frendewey, D., Valenzuela, D., Kutok, J.L., Schmidt-Suppran, M., Rajewsky, N., Yancopoulos, G., Rao, A., Rajewsky, K., 2007. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 316, 604–608.

- Tomer, Y., 1997. Anti-thyroglobulin autoantibodies in autoimmune thyroid diseases: cross-reactive or pathogenic? *Clinical Immunology and Immunopathology* 82, 3–11.
- Tomer, Y., Huber, A., 2009. THE ETIOLOGY OF AUTOIMMUNE THYROID DISEASE: A STORY OF GENES AND ENVIRONMENT. *J Autoimmun* 32, 231–239.
- Vanderpump, M.P., Tunbridge, W.M., French, J.M., Appleton, D., Bates, D., Clark, F., Evans, J.G., Hasan, D.M., Rodgers, H., Tunbridge, F., et al., 1995. The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Wickham Survey. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 41, 55–68.
- Vasudevan, S., Tong, Y., Steitz, J.A., 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318, 1931–1934.
- Wang, J., Zhang, Weiping, Liu, H., Wang, D., Wang, W., Li, Y., Wang, Z., Wang, L., Zhang, Wei, Huang, G., 2010. Parvovirus B19 infection associated with Hashimoto's thyroiditis in adults. *J. Infect.* 60, 360–370.
- Wienholds, E., Plasterk, R.H.A., 2005. MicroRNA function in animal development. *FEBS Letters* 579, 5911–5922.
- Wolchok, J.D., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Rutkowski, P., Grob, J.-J., Cowey, C.L., Lao, C.D., Wagstaff, J., Schadendorf, D., Ferrucci, P.F., Smylie, M., Dummer, R., Hill, A., Hogg, D., Haanen, J., Carlino, M.S., Bechter, O., Maio, M., Marquez-Rodas, I., Guidoboni, M., McArthur, G., Lebbé, C., Ascierto, P.A., Long, G.V., Cebon, J., Sosman, J., Postow, M.A., Callahan, M.K., Walker, D., Rollin, L., Bhorre, R., Hodi, F.S., Larkin, J., 2017. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 377, 1345–1356.
- Wortsman, J., Rosner, W., Dufau, M.L., 1987. Abnormal testicular function in men with primary hypothyroidism. *The American Journal of Medicine* 82, 207–212.
- Xiao, C., Rajewsky, K., 2009. MicroRNA Control in the Immune System: Basic Principles. *Cell* 136, 26–36.
- Xie, X., Lu, J., Kulbokas, E.J., Golub, T.R., Mootha, V., Lindblad-Toh, K., Lander, E.S., Kellis, M., 2005. Systematic discovery of regulatory motifs

in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals.  
Nature 434, 338–345.

Yilmaz, H.O., Cebi, A.H., Kocak, M., Ersoz, H.O., Ikbali, M., 2021. MicroRNA Expression Levels in Patients with Hashimoto Thyroiditis: A Single Centre Study. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 21, 1066–1072.

Zhou, B., Wang, S., Mayr, C., Bartel, D.P., Lodish, H.F., 2007. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *PNAS* 104, 7080–7085.